

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALYSSON HENRIQUE URBANSKI

**INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO *IN VITRO* ENTRE AS PROTEÍNAS PII, GlnZ E
GlnB, COM UMA DIGUANILATO CICLASE (AZOBR_140132) E UMA
FOSFODIESTERASE (AZOBR_P1130052) DE *Azospirillum brasilense* Sp245**

CURITIBA

2018

ALYSSON HENRIQUE URBANSKI

**INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO *IN VITRO* ENTRE AS PROTEÍNAS PII, GlnZ E
GlnB, COM UMA DIGUANILATO CICLASE (AZOBR_140132) E UMA
FOSFODIESTERASE (AZOBR_P1130052) DE *Azospirillum brasilense* Sp245**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências - Bioquímica,
no Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica,
Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal
do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Berenice Reynaud
Steffens

Coorientadores: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo
Dra. Edileusa Cristina Marques
Gerhardt

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Urbanski, Alysson Henrique

Investigação da interação *in vitro* entre as proteínas PII, GlnZ e GlnB, com uma diguanilato ciclase (AZOBR_140132) e uma fosfodiesterase (AZOBR_P1130052) de *Azospirillum brasilense* Sp245. / Alysson Henrique Urbanski. – Curitiba, 2018.

96 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Maria Berenice Reynaud Steffens

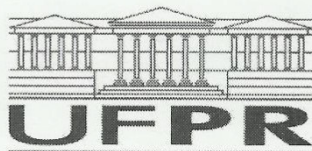
Coorientador: Luciano Fernandes Huergo

Coorientadora: Edileusa Cristina Marques Gerhardt

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Proteínas. 2. Fosfodiesterase. Título. II. Steffens, Maria Berenice Reynaud. III. Huergo, Luciano Fernandes. IV. Gerhardt, Edileusa Cristina Marques. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.19296



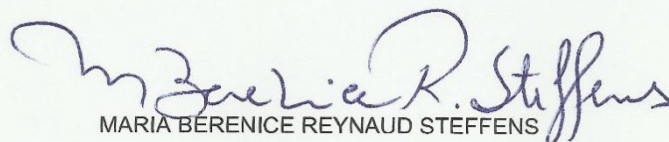
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ALYSSON HENRIQUE URBANSKI** intitulada: **Investigação da interação *in vitro* entre proteínas PII, GlnZ e GlnB, com uma diguanilato ciclase (AZOBR_140132) e uma fosfodiesterase (AZOBR_p1130052) de *Azospirillum brasilense* Sp245**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 21 de Março de 2018.


MARIA BERENICE REYNAUD STEFFENS

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


DAYANE ALBERTON

Avaliador Externo (UFPR)


FABIO DE OLIVEIRA PEDROSA

Avaliador Interno (UFPR)

Dedico este trabalho à minha
família: Kathia, Lindolfo e José.
Base segura em dias ensolarados,
abrigo terno em tempestades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser provedor e inspirador em minha vida, além de refúgio em meditação.

À minha orientadora, Professora Dra. Maria Berenice R. Steffens, pelo acolhimento, confiança, exemplo e por todos os ensinamentos passados com paciência e dedicação.

Ao Professor Dr. Luciano F. Huergo, pela coorientação, por todo o conhecimento transmitido e pela confiança no projeto, mesmo em momentos difíceis.

À Dra. Edileusa C. M. Gerhardt, minha coorientadora, que, com um espírito quase maternal, me instruiu desde o princípio em inúmeras situações práticas, compartilhando conhecimento, além de bons resultados e momentos.

À Prof^a. Dra. Leda Chubatsu, pelas correções do projeto e relatório, tornando esse trabalho melhor.

Aos amigos de maior convivência: Ana, Giu, Fernanda, Heloisa, Marcelo, Adrian e Rafa, não só por toda a ajuda prática e troca intelectual, mas também pelos bons momentos, risadas e companheirismo durante todas as fases vividas nestes dois anos. Aprendi muito com cada um e sou grato por isso.

A todos os outros professores, técnicos e alunos do departamento de Bioquímica, pelos ensinamentos, trocas e convívio.

Ao CNPq/INCT, CAPES e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

Aos amigos Adam e Daiana, pelos inúmeros cafés filosóficos e infinita parceria durante essa e outras fases.

À minha família – minha mãe Kathia, meu pai Lindolfo e meu padrasto José – por ser a base de quem eu sou e sempre me dar confiança para alçar voos maiores.

*Like the moon, we borrow our light
I am nothing but a shadow in the night
So, if you let me, I will catch fire
To let your glory and mercy shine*

Part II - Paramore

RESUMO

A família das proteínas PII é presente em bactérias, arqueias e plantas, possuindo a capacidade de modular a atividade de outras proteínas por interações do tipo proteína-proteína. Dessa forma, elas coordenam processos celulares relacionados, principalmente, ao metabolismo de nitrogênio. A ligação de uma PII aos efetores ATP, ADP e 2-oxoglutarato (2-OG) altera sua conformação e, consequentemente, pode modular a interação com seus alvos. Outro evento que pode influenciar nas interações de PII é a sua uridililação, que responde aos níveis de nitrogênio. Recentemente, 125 proteínas de *Azospirillum brasilense* foram descritas como potenciais alvos de interação da proteína PII GlnZ, em diferentes vias metabólicas. O objetivo deste trabalho foi validar alguns desses potenciais alvos, através da clonagem e expressão heteróloga dessas proteínas para posteriores ensaios de interação por coprecipitação *in vitro*. Como resultados, não foram visualizadas interações entre GlnZ e RpoN ou EIIN^{Ntr} de *A. brasilense* FP2. Por outro lado, GlnZ foi capaz de formar complexos, na presença de ATP ou ADP, com uma diguanilato ciclase e uma fosfodiesterase de *A. brasilense* Sp245, enzimas envolvidas na síntese e degradação, respectivamente, do diguanilato cíclico (c-di-GMP), um importante segundo mensageiro em bactérias. A formação dos complexos DGC/GlnZ e PDE/GlnZ foi inibida pela adição de 2-OG junto ao ATP, de maneira dependente da concentração de 2-OG. A uridililação de GlnZ, entretanto, não aparentou influenciar nas interações. Os resultados sugerem que a interação de GlnZ com DGC ou PDE parece ser mais responsiva ao metabolismo de carbono do que ao de nitrogênio, e que essas interações podem influenciar a sinalização por c-di-GMP.

Palavras-chave: Proteínas PII. Diguanilato ciclase. Fosfodiesterase. Interação proteína-proteína.

ABSTRACT

The PII protein family is present in bacteria, archaea and plants, and can modulate the activity of other proteins through protein-protein interactions. For this reason, they coordinate cellular processes that are mainly related to nitrogen metabolism. The PII binding to the effectors ATP, ADP and 2-oxoglutarate (2-OG) changes its conformation and, consequently, can modulate the interaction with their targets. Another event that can influence the PII interactions is its uridylation, which is controlled by nitrogen levels. Recently, 125 proteins of *Azospirillum brasilense* were described as potential interaction targets of the GlnZ PII protein, in different metabolic pathways. The objective of this work was to validate some of these potential targets through the cloning and heterologous expression of these proteins, followed by *in vitro* co-precipitation assays. As result, no interactions between GlnZ and RpoN or EIIA^{Ntr} of *A. brasilense* FP2 were visualized. On the other hand, GlnZ was able to interact, in the presence of ATP or ADP, with a diguanylate cyclase and a phosphodiesterase of *A. brasilense* Sp245, enzymes involved in the synthesis and degradation of cyclic diguanylate (c-di-GMP), an important second messenger in bacteria. The formation of the DGC/GlnZ and PDE/GlnZ complexes was inhibited by the 2-OG in the presence of ATP, in a 2-OG concentration-dependent manner. GlnZ uridylation, however, did not appear to influence the interactions. The results suggest that the interaction of GlnZ with DGC or PDE is more responsive to carbon than to nitrogen metabolism, and that these interactions may influence c-di-GMP signaling.

Key-words: PII proteins. Diguanylate cyclase. Phosphodiesterase. Protein-protein interaction.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA DA PROTEÍNA PII	18
FIGURA 2 – ESTRUTURA, SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DO C-DI-GMP	26
FIGURA 3 – COMPARAÇÃO ESTRUTURAL ENTRE DIGUANILATO E ADENILATO CICLASES.....	28
FIGURA 4 – CLASSIFICAÇÃO DE DOMÍNIOS GGDEF BASEADA NA CONSERVAÇÃO DE SEUS MOTIVOS	29
FIGURA 5 – ESTRUTURA DIMÉRICA E CATÁLISE POR DIGUANILATO CICLASES.....	30
FIGURA 6 – ORGANIZAÇÃO ESPACIAL DO DOMÍNIO GGDEF.	31
FIGURA 7 – MODELOS SOBRE A ESPECIFICIDADE NA SINALIZAÇÃO POR C-DI- GMP.....	33
FIGURA 8 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>rpoN</i>	51
FIGURA 9 – DIGESTÃO DO PLASMÍDEO pAHUrpoNHis.....	52
FIGURA 10 – EXPRESSÃO DE RpoN DE <i>A. brasilense</i>	53
FIGURA 11 – INVESTIGAÇÃO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO ENTRE RpoN E GlnZ.....	54
FIGURA 12 – EXPRESSÃO DE EIIA ^{Ntr} DE <i>A. brasilense</i>	55
FIGURA 13 – INVESTIGAÇÃO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO ENTRE EIIA ^{Ntr} E GlnZ.....	56
FIGURA 14 – SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E ORGANIZAÇÃO DE DOMÍNIOS DA DIGUANILATO CICLASE (DGC) DE <i>A. brasilense</i> Sp245.....	57
FIGURA 15 – EXPRESSÃO DE DGC DE <i>A. brasilense</i>	58
FIGURA 16 – FORMAÇÃO DE COMPLEXO ENTRE GlnZ E DGC <i>IN VITRO</i>	59
FIGURA 17 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE 2-OG NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO GlnZ/DGC <i>IN VITRO</i> NA PRESENÇA DE ATP	60
FIGURA 18 – EFEITO DO 2-OG NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO GlnZ/DGC <i>IN</i> <i>VITRO</i> NA PRESENÇA DE ADP	61
FIGURA 19 – EFEITO DE Mg ⁺² NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO GlnZ/DGC <i>IN</i> <i>VITRO</i>	61
FIGURA 20 - EFEITO DA AUSENCIA DA ALÇA-T NA INTERAÇÃO ENTRE GlnZ E DGC	62

FIGURA 21 – FORMAÇÃO DE COMPLEXO ENTRE GlnZ-UMP ₃ E DGC <i>IN VITRO</i>	63
FIGURA 22 – FORMAÇÃO DE COMPLEXO ENTRE GlnB E DGC <i>IN VITRO</i>	64
FIGURA 23 – SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E ORGANIZAÇÃO DE DOMÍNIOS DA FOSFODIESTERASE (PDE) DE <i>A. brasilense</i> Sp245.....	65
FIGURA 24 – EXPRESSÃO DE PDE DE <i>A. brasilense</i>	66
FIGURA 25 – FORMAÇÃO DE COMPLEXO ENTRE GlnZ E PDE <i>IN VITRO</i>	67
FIGURA 26 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE 2-OG NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO GlnZ/PDE <i>IN VITRO</i> NA PRESENÇA DE ATP	68
FIGURA 27 – EFEITO DO 2-OG NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO GlnZ/PDE <i>IN VITRO</i> NA PRESENÇA DE ADP	69
FIGURA 28 – EFEITO DE Mg ⁺² NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO GlnZ/PDE <i>IN VITRO</i>	69
FIGURA 29 – FORMAÇÃO DE COMPLEXO ENTRE GlnZΔT-LOOP E PDE <i>IN VITRO</i>	70
FIGURA 30 – FORMAÇÃO DE COMPLEXO ENTRE GlnZ-UMP ₃ E PDE <i>IN VITRO</i>	71
FIGURA 31 – FORMAÇÃO DE COMPLEXO ENTRE GlnB E PDE <i>IN VITRO</i>	72
FIGURA 1 – CARACTERÍSTICAS DA FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS ENTRE GlnZ E DGC OU PDE	77
FIGURA 33 – HIPÓTESE DA FORMAÇÃO DE UM COMPLEXO TERNÁRIO ENTRE GlnZ, DGC E PDE	81
FIGURA 34 – HIPÓTESE PARA JUSTIFICAR A PERDA DE MOTILIDADE DE MUTANTES <i>glnB</i>	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROTEÍNAS SELECIONADAS PARA O TRABALHO	21
TABELA 2 – ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS	40
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DA REAÇÃO DE PCR	42
TABELA 4 – LISTA DOS GENES E SEUS RESPECTIVOS INICIADORES.....	43
TABELA 5 – COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO DE INTERAÇÃO.....	49
TABELA 6 – LISTA DE GENES AMPLIFICADOS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-OG	-	2-oxoglutarato
5-pgpg	-	5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina
ADP	-	5' difosfato de adenosina
ATP	-	5' trifosfato de adenosina
c-di-GMP	-	diguanilato cíclico
DGC	-	provável diguanilato ciclase de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 (AZOBR_140132)
DGCs	-	diguanilato ciclases
DNA	-	ácido desoxirribonucleico
DraG	-	dinitrogenase redutase glicohidrolase
DraT	-	dinitrogenase ADP-ribosil transferase
GMP	-	5' monofosfato de guanosina
GTP	-	5' trifosfato de guanosina
IPTG	-	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa	-	kilodalton
Km ^r	-	resistência a canamicina
LB	-	Luria-Bertani
NAD ⁺	-	nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NAGK	-	acetilglutamato quinase
Nal ^r	-	resistência a ácido nalidíxico
pb	-	pares de base
PCR	-	reação em cadeia da polimerase
PDE	-	provável fosfodiesterase de <i>A. brasilense</i> Sp245 (AZOBR_p1130052)
PDEs	-	fosfodiesterases
RNA	-	ácido ribonucleico
rpm	-	rotações por minuto
Sm ^r	-	resistência a estreptomicina
U	-	Unidade enzimática
v/v	-	volume por volume
TI	-	tampão de interação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	GÊNERO <i>AZOSPIRILLUM</i>	15
1.2	PROTEÍNAS PII	16
1.3	DIGUANILATO CÍCLICO	25
1.3.1	SÍNTESE DE C-DI-GMP E SINALIZAÇÃO	27
1.3.2	DEGRADAÇÃO DE C-DI-GMP	34
1.4	C-DI-GMP EM <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i>	36
2	JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	METODOLOGIA	40
4.1	BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	40
4.2	MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO CELULAR	41
4.3	AMPLIFICAÇÃO DE DNA	42
4.4	CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS	43
4.5	ELETROFORESE DE DNA	44
4.6	PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	44
4.7	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO	44
4.8	EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM SISTEMA HETERÓLOGO	45
4.9	PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS GLNB E GLNZ	45
4.10	PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM CAUDA DE POLIHISTIDINA	46
4.11	URIDILILAÇÃO DE PII	46
4.12	PURIFICAÇÃO DE EIIA ^{NTR}	47
4.13	PURIFICAÇÃO DE DGC E PDE	47
4.14	DOSAGEM DE PROTEÍNAS	48
4.15	ELETROFORESE DE PROTEÍNAS	48
4.16	ENSAIOS DE INTERAÇÃO POR COPRECIPITAÇÃO <i>IN VITRO</i>	49
5	RESULTADOS	50
5.1	AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DE GENES SELECIONADOS	50
5.2	RPON	52
5.2.1	Expressão e purificação de RpoN	53

5.2.2	Ensaio de interação entre as proteínas GlnZ e RpoN por coprecipitação	53
5.3	EIIA ^{NTR}	54
5.3.1	Expressão e purificação de EIIA ^{Ntr}	55
5.3.2	Ensaio de interação entre as proteínas EIIA ^{Ntr} e GlnZ por coprecipitação ...	55
5.4	DIGUANILATO CICLASE	56
5.4.1	Expressão da Diguanilato Ciclase	57
5.4.2	Ensaio de interação por coprecipitação	58
5.5	FOSFODIESTERASE	64
5.5.1	Expressão da Fosfodiesterase	66
5.5.2	Ensaio de interação por coprecipitação	67
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS	85

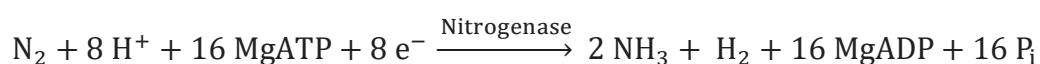
1 INTRODUÇÃO

1.1 GÊNERO *AZOSPIRILLUM*

As bactérias do gênero *Azospirillum* pertencem à subclasse das Alfaproteobactérias, que engloba outros gêneros simbióticos ou associados a plantas, como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Agrobacterium* (HARTMANN; BALDANI, 2006). São bactérias Gram-negativas, encontradas no solo ou associadas a raízes, caules, folhas e sementes de gramíneas como milho, trigo, arroz e sorgo, fixadoras de nitrogênio e consideradas promotoras de crescimento vegetal (BALDANI *et al.*, 2015; STEENHOUTD; VANDERLEYDEN, 2000). Em geral, colonizam apenas a rizosfera, mas também podem estar presentes no interior de raízes (ROTHBALLER; SCHMID; HARTMANN, 2003). O gênero contém 17 espécies, sendo *A. brasilense* uma das mais estudadas (BALDANI; BALDANI, 2005; EUZÉBY, 1997; FIBACH-PALDI; BURDMAN; OKON, 2012).

Essas bactérias são potenciais biofertilizantes, uma vez que sua inoculação em sementes além de promover o crescimento vegetal e aumentar seu rendimento, contribui para a redução do uso de fertilizantes químicos, especialmente dos nitrogenados. Apesar do conhecimento acumulado acerca da fixação biológica de nitrogênio, esse processo não parece ser o principal responsável pelos efeitos benéficos que resultam no incremento do crescimento das plantas. *A. brasilense*, por exemplo, produz diversos reguladores de crescimento de plantas (fitormônios), que provavelmente contribuem para os efeitos observados sobre o crescimento vegetal (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004; DOBBELAERE *et al.*, 2001).

Azospirillum fixa N₂ em NH₃ em condições microaeróbicas pela ação do complexo enzimático da nitrogenase, composto por duas proteínas: (a) dinitrogenase, proteína Ferro-Molibdênio (FeMo) ou NifDK, que é responsável pela redução do N₂, e (b) dinitrogenase redutase, proteína Ferro (Fe) ou NifH, que tem como função transferir elétrons para a dinitrogenase ao custo de ATP (DIXON; KAHN, 2004; STACEY; BURRIS; EVANS, 1993; STEENHOUTD; VANDERLEYDEN, 2000). A reação ideal catalisada pela nitrogenase pode ser representada pela seguinte equação (SEEFELDT; HOFFMAN; DEAN, 2009):



Além do evidente consumo de ATP, outro fator que torna a reação catalisada pela enzima nitrogenase energeticamente dispendiosa para a célula é o seu baixo número de renovação, o que obriga a síntese de altas quantidades dessa enzima, chegando a representar até 20% da proteína total, para que a célula possa utilizar o dinitrogênio como única fonte de nitrogênio. Dessa forma, organismos diazotróficos desenvolveram mecanismos precisos para regular a síntese e atividade da nitrogenase (DIXON; KAHN, 2004; POSTGATE, 1998).

Um dos principais mecanismos de controle da nitrogenase é a modificação pós-traducional da proteína NifH, numa reação de ADP-ribosilação, fazendo com que o complexo enzimático perca sua atividade (HUERGO *et al.*, 2012). As enzimas que catalisam a adição e remoção de ADP-ribosil à nitrogenase em *A. brasilense* são DraT e DraG, respectivamente (ZHANG; BURRIS; ROBERTS, 1992). Um grupo de proteínas envolvidas na regulação de DraT/DraG, e também na regulação do metabolismo do nitrogênio, é o das proteínas PII (HUERGO *et al.*, 2012; NORDLUND; HÖGBOM, 2013; ZHANG; BURRIS; ROBERTS, 1992).

1.2 PROTEÍNAS PII

Proteínas PII constituem uma família de proteínas ubiquamente distribuídas entre bactérias, arqueias e plantas, que possuem a capacidade de modular a atividade de outras proteínas por interações proteína-proteína. Dessa forma elas coordenam a atividade de enzimas, fatores de transcrição e transportadores de membrana relacionados, principalmente, ao metabolismo de nitrogênio (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013).

Proteobactérias comumente possuem duas proteínas PII: GlnK e GlnB, codificadas pelos genes *glnK* e *glnB*, respectivamente. Essas duas proteínas apresentam alta semelhança estrutural e, de fato, suas funções por vezes se sobrepõem (FORCHHAMMER, 2008). Enquanto o gene *glnK* localiza-se no mesmo operon que o gene do transportador de amônio *amtB*, o gene *glnB* está, com poucas exceções descritas, em um operon junto ao gene da glutamina sintetase (*glnA*) ou ao gene da NAD⁺ sintetase (*nadE*) (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001). *A. brasilense* possui duas proteínas PII: GlnB e GlnZ. O gene *glnZ* é ortólogo de *glnK*, porém monocistrônico, e assim como *glnB* tem sua expressão controlada pela

proteína NtrC, sendo aumentada em condições de limitação de nitrogênio (DE ZAMAROCZY, 1998; SANT'ANNA *et al.*, 2009).

As estruturas de PII já cristalizadas indicam que além das suas sequências nucleotídicas serem muito semelhantes, as estruturas tridimensionais são altamente conservadas. Na Figura 1 está mostrada a estrutura de GlnB de *E. coli*. As PII são homotriméricas e cada subunidade apresenta massa molecular de 12-13 kDa. Apresentam estrutura de barril compacto, onde cada monômero possui 2 α -hélices e 4 β -folhas divididas em dois motivos $\beta\alpha\beta$ conectados por uma estrutura de alça flexível de 19 aminoácidos (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013; MERRICK, 2015). Esta alça, denominada alça-T (*loop*-T, em inglês) é altamente flexível e vital para a interação de PII com diversos alvos. Em algumas proteínas PII descritas, a alça-T pode sofrer modificação pós-traducional reversível, como a uridililação no resíduo Tyr51 que ocorre em *Proteobacteria* pela ação da enzima bifuncional GlnD (uridililtransferase/removedora de uridilil - UTase/UR) (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001; CHEAH *et al.*, 1994; SON; RHEE, 1987). Além da alça-T, existem mais duas alças presentes em cada monômero: uma menor, denominada alça-B, localizada entre a segunda α -hélice e a quarta β -folha, e outra alça localizada na porção C-terminal, denominada alça-C. No trímero, as alças T e B de um monômero formam, em conjunto com a alça-C do monômero adjacente, uma fenda que permite a ligação de efetores (FIGURA 1) (TRUAN *et al.*, 2010; HUERGO *et al.*, 2013).

As proteínas PII ligam os efetores ATP, ADP e 2-oxoglutarato (2-OG) nas 3 fendas entre os monômeros (TRUAN *et al.*, 2010; XU *et al.*, 1998). Cada fenda pode conter ATP, ATP + Mg^{2+} (ATP.Mg), ATP.Mg + 2-OG ou ADP (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013; MERRICK, 2015; TRUAN *et al.*, 2014). Além de modular a atividade de PII monitorando a disponibilidade de carbono, 2-OG também pode transmitir informações sobre o estado do metabolismo de nitrogênio. Por participar do processo de assimilação de nitrogênio por ação da glutamina sintetase, o acúmulo de 2-OG pode indicar a disponibilidade de carbono (de maneira diretamente proporcional) ou de nitrogênio (inversamente proporcional). Portanto, essa molécula tem potencial de atuar na regulação do metabolismo de carbono, via proteínas PII. Além disso, devido a ligação competitiva de ATP e ADP, as proteínas PII podem atuar como sensores do estado energético da célula (MERRICK, 2015).

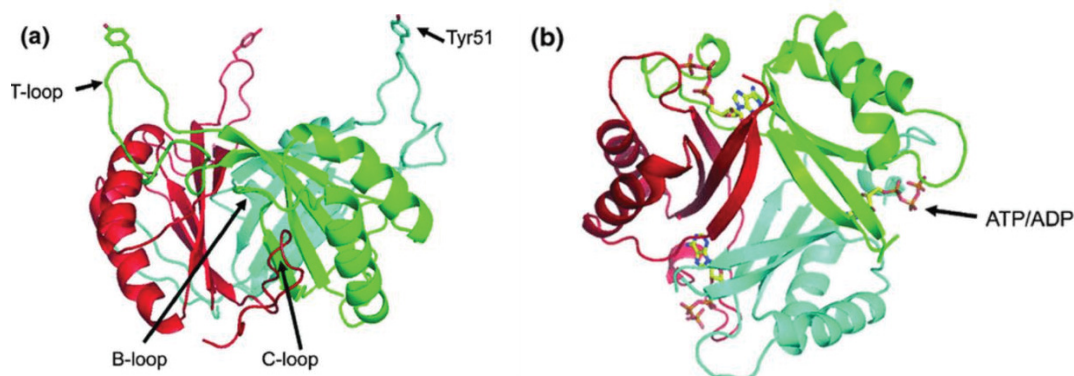


FIGURA 2 – ESTRUTURA DA PROTEÍNA PII. (a) Visão lateral do trîmero GlnB de *E. coli* na ausência de efetores. As setas indicam os as alças (*loops*) B, C e T, e a cadeia lateral do aminoácido Tyr51, descrito como sítio de uridililação reversível em algumas proteobactérias. (b) Visão da face superior do trîmero GlnB de *E. coli* ligado a ATP. A seta indica a fenda onde ATP e ADP se ligam competitivamente. FONTE: Adaptado de Huergo, Chandra e Merrick, 2013.

Em todos os casos descritos, o efeito regulatório de PII acontece por interação direta com seus alvos e, respondendo à variação dos efetores e, em muitas vezes, envolve a alça-T, como na interação de GlnB com a adenililtransferase (GlnE), uridililtransferase (GlnD) e a histidina quinase NtrB (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013; JAGGI *et al.*, 1996; JIANG *et al.*, 1997; JIANG; ZUCKER; NINFA, 1997). Devido a sua natureza flexível e por conter o sítio de uridililação, a alça-T é sugerida como a responsável por modular o processo regulatório de PII sobre seus alvos. Além disso, como mostram estudos de cristalografia, a ligação da proteína aos efetores por si só já é capaz de modificar a conformação dessa alça, alterando a interação de PII com proteínas-alvo (CONROY *et al.*, 2007; JIANG; NINFA, 2007, 2009; MERRICK, 2015; TRUAN *et al.*, 2010).

Como os genes *glnK* e *amtB* costumam apresentar vizinhança genética, acredita-se que a interação entre a proteína GlnK e AmtB seja uma das mais antigas interações entre PII e seus alvos (JAVELLE; MERRICK, 2005). O transportador de amônio AmtB é uma proteína integral de membrana que permite o fluxo de amônio por meio de poros (KHADEMI *et al.*, 2004). Dependendo do estado de modificação pós-traducional de PII e das concentrações intracelulares de seus efetores, ela pode, através de sua alça-T, associar-se ao transportador AmtB e impedir o influxo de amônio (KHADEMI *et al.*, 2004; RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010). A influência dos efetores na interação de GlnK e AmtB foram estudadas em *E. coli* por Radchenko e colaboradores (2010). Quando os níveis de nitrogênio intracelular se elevam, os níveis de 2-OG diminuem e ADP liga-se à proteína GlnK. A presença de

ADP leva a uma mudança conformacional na alça-T que facilita a interação de GlnK com AmtB. Por outro lado, quando o nível de nitrogênio dentro da célula é baixo, a concentração de 2-OG é alta e espera-se encontrar 2-OG e ATP.Mg ligado em GlnK, nesse cenário a alça-T assume uma conformação desfavorável à interação GlnK-AmtB (MERRICK, 2015; RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010).

Como citado, a atividade da nitrogenase é regulada pela ação das enzimas DraT e DraG, adicionando ou removendo um grupo ADP-ribosil à dinitrogenase redutase, respectivamente, e as atividades de DraT/DraG são reguladas por PII. Quando *A. brasilense* está fixando nitrogênio, DraT não interage com GlnB, que se encontra uridililada por ação de GlnD. GlnB é desuridililada após a adição de amônio ao meio, o que permite a sua interação com NtrB. Nesse momento, a nitrogenase é ADP-ribosilada, sugerindo que a formação do complexo GlnB/DraT ativa DraT. A estabilidade desse complexo responde positivamente a ADP e negativamente a ATP e 2-OG (HUERGO *et al.*, 2006). Simultaneamente, na situação de choque de amônio e presença de ADP, a proteína GlnZ desuridililada tem sua interação com DraG favorecida e, ao mesmo tempo, interage com o transportador AmtB, formando um complexo ternário que inibe a atividade de DraG sobre NifH (HUERGO *et al.*, 2007).

PII de plantas e cianobactérias controlam, através de interação proteína-proteína, a atividade de NAGK (acetilglucosamina quinase), que é uma enzima chave na biossíntese de arginina, a forma destes organismos estocarem nitrogênio (BURILLO *et al.*, 2004; HEINRICH *et al.*, 2004). Quando há alta disponibilidade de nitrogênio no ambiente, há a formação de um complexo entre PII e NAGK, aumentando a atividade catalítica da última, favorecendo o estoque de nitrogênio em forma de cianoficina (FORCHHAMMER, 2008). Em *Synechococcus elongatus*, o complexo PII-NAGK é estabilizado por ATP, sendo desestabilizado em altas concentrações de 2-OG (FOKINA *et al.*, 2010).

Considerando o metabolismo de nitrogênio, as PII também interagem com o sistema NtrB-NtrC. Em *E. coli*, a atividade desse sistema é controlada por GlnB. Em condições de excesso de nitrogênio, a proteína GlnB não uridililada interage com NtrB, estimulando a desfosforilação de NtrC, inativando-a. Quando há falta de nitrogênio no meio, a proteína GlnB é uridililada por GlnD e não mais interage com NtrB, que na sua forma livre catalisa a fosforilação de NtrC (JIANG; NINFA, 1999). A proteína NtrC é um ativador de transcrição de genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio, com

promotores do tipo sigma 54 (BUCK *et al.*, 2000), como GlnZ e GlnB em *A. brasilense* (DE ZAMAROCZY, 1998).

A sugestão que PII pode regular o metabolismo de carbono decorreu da observação de sua interação com BCCP, uma componente da enzima Acetil-CoA carboxilase, que atua na via de síntese de ácidos graxos (RODRIGUES *et al.*, 2014). Mais tarde foi mostrado que GlnB atua como reguladora da atividade da Acetil-CoA carboxilase, respondendo aos níveis de 2-oxoglutarato (GERHARDT *et al.*, 2015). Através de ensaios *in vitro*, Gerhardt (2015) identificou 125 proteínas como potenciais alvos de PII em *A. brasilense* ao imobilizar GlnZ com cauda de histidina em uma coluna cromatográfica. Essa lista de proteínas foi obtida ao eluir extratos celulares de *A. brasilense* 2812 (*glnB⁻/GlnZ⁻*) utilizando diferentes concentrações de ADP, ATP e 2-OG para a interação e eluição das proteínas. As proteínas eluídas foram comparadas com a eluição controle de uma coluna sem a presença de GlnZ e os potenciais alvos proteicos de PII obtidos nesse ensaio foram identificados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC/MS) quantitativa, gerando uma lista com 125 proteínas distribuídas em diversos processos celulares, como metabolismo de nitrogênio, carboidratos, lipídeos, aminoácidos e sinalização intracelular. Como a autora sugere, essa lista pode conter falsos positivos, sendo necessária a validação das interações através de ensaios de coprecipitação e de avaliação de atividade específica.

Na tabela 1 estão listadas as proteínas selecionadas a partir das 125 identificadas por Gerhardt (2015), que foram escolhidas como foco deste projeto para a validação de suas interações com PII. A seguir, é apresentado um resumo sobre cada uma delas.

A Leucina aminopeptidase, codificada em *A. brasilense* Sp245 pelo gene *pepA*, pertence à família de metalopeptidases M17. Essas enzimas são exopeptidases que catalisam a remoção de aminoácidos (preferencialmente, mas não exclusivamente, leucinas) na porção N-terminal de proteínas, exercendo papel fundamental na degradação proteica e no metabolismo de peptídeos biologicamente ativos e aminoácidos (BHOSALE; BHASKARLA; NANDI, 2013; COLLOMS, 2013; MARCHLER-BAUER *et al.*, 2015).

TABELA 1 – PROTEÍNAS SELECIONADAS PARA O TRABALHO

Proteína (gene)	Via metabólica/Função biológica	Tamanho do gene (nucleotídeos)	Massa da proteína (kDa)
Leucina aminopeptidase (<i>pepA</i>)	Exopeptidase envolvida no catabolismo proteico e metabolismo de peptídeos biologicamente ativos	1404	49
Proteína PEP- fosfotransferase (EI) (<i>ptsI</i>)	Quinase/transferase presente no sistema de transporte de açúcar fosfotransferase (PTS)	1773	64
Sistema permease PTS (IIAMan)/proteína regulatória de nitrogênio IIA (EIIA) (<i>AZOBR_p430053</i>)	Sistema fosfotransferase relacionado ao metabolismo de nitrogênio (PTS ^{Ntr})	402	14,2
Fosfopantotenoilcistei na decarboxilase (CoaC) fosfopantotenatocistei na ligase (CoaB) (<i>coaBC</i>)	Proteína bifuncional presente na via de biossíntese da coenzima A e catabolismo do pantotenato	1257	44
Provável diguanilato ciclase, domínio GGDEF (<i>AZOBR_140132</i>)	Ciclização de nucleotídeos	1038	38
Provável Diguanilato ciclase/fosfodiesteras e com domínio PAS/PAC (<i>AZOBR_p1130052</i>)	Ciclização de nucleotídeos; domínios PAS estão relacionados com o monitoramento de níveis redox, de oxigênio, luz e outros	2517	93
Provável hidrolase da superfamília metalo-β- lactamase (<i>AZOBR_100259</i>)	Hidrolase; possivelmente ribonuclease	1719	62
Provável transdutora de sinal histidina quinase (<i>AZOBR_p280115</i>)	Catalisa a fosforilação de um resíduo de His em resposta à alteração de alguma variável celular; possivelmente envolvida na regulação da transcrição	1854	67
RpoN (Fator sigma 54 da RNA polimerase) (<i>rpoN</i>)	Fator de transcrição que regula a expressão de genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio	1578	58
TrkA (<i>trkA</i>)	Transporte de K ⁺ na membrana plasmática	1377	50
Fosforibosilaminoimid azol- succinocarboxamida sintase (<i>purC</i>)	Presente na via de biossíntese <i>de novo</i> de nucleotídeos púricos	765	29

LISTA DAS PROTEÍNAS SELECIONADAS A PARTIR DO CONJUNTO DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS COMO TENDO POTENCIAL INTERAÇÃO COM PROTEÍNAS PII.

FONTE: Adaptado de Gerhardt, 2015.

A proteína PEP-Fosfotransferase, codificada em *A. brasilense* Sp245 pelo gene *ptsI*, é o componente EI do sistema de fosfotransferases (PTS). O sistema PTS catalisa a translocação e a fosforilação de hexoses para o interior da célula. Nesse processo, a Enzima I (EI) autofosforila-se a partir do grupo fosforil do fosfoenolpiruvato (PEP) e o transfere para outra enzima carreadora deste grupo (HPr). EI e HPr atuam como doadores de grupo fosforil para transportadores associados à membrana, chamados componentes EII, específicos para cada tipo de açúcar. Em *E. coli*, o complexo EII para D-glucose é formado por uma proteína citosólica (EIIGlc) e outra integral de membrana (EIICB^{Glc}). O grupo fosforil é transferido de HPr para EIIGlc e, posteriormente, para a D-glucose que entra (HUERGO & DIXON, 2015).

Os componentes EII também apresentam atividades regulatórias. Por exemplo, quando D-glucose está disponível, os componentes do sistema PTS encontram-se desfosforilados e, nesse cenário, EIIGlc liga-se a transportadores de fontes não preferenciais de carbono, impedindo o influxo destes açúcares e levando a não indução dos genes necessários para seu catabolismo. Já quando D-glucose não está disponível no meio, os componentes do sistema PTS encontram-se fosforilados. EIIGlc fosforilada ativa a adenilato ciclase (AC), levando ao acúmulo de cAMP que, ao se ligar a CRP, altera a expressão de vários genes. Além disso, na presença de fontes de carbono não preferenciais (não PTS) e limitação de nitrogênio, as concentrações de cAMP também são reduzidas, indicando que a atividade de AC pode ser regulada independentemente do estado de fosforilação do sistema PTS. Recentemente, foi descrito que 2-OG impede a fosforilação dos componentes PTS a partir da autofosforilação de EI. Dessa forma, a razão 2-OG/fosfoenolpiruvato poderia controlar, não somente o transporte de açúcares através do sistema PTS, mas também toda a sinalização celular orquestrada pelo sistema PTS. Adicionalmente, os níveis de 2-OG parecem regular a atividade da AC, por um mecanismo ainda desconhecido em resposta aos níveis de carbono e nitrogênio (YOU *et al.*, 2013).

Além do sistema canônico PTS que controla a assimilação de fontes de carbono, algumas bactérias codificam um sistema parálogo denominado PTS^{Ntr}. Os genes estruturais do sistema PTS^{Ntr} em proteobactérias geralmente estão localizados na vizinhança do gene *rpoN* que codifica a proteína RpoN (Fator Sigma 54 da RNA polimerase), fator responsável pela expressão de diversos genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio (COMMICHAU; FORCHHAMMER; STÜLKE, 2006; POWELL *et al.*, 1995; REIZER *et al.*, 1992).

A proteína RpoN, ou Fator Sigma 54 da RNA Polimerase, é codificada em *A. brasilense* Sp245 pelo gene *rpoN*. Fatores sigma permitem que a RNA Polimerase faça o reconhecimento de promotores específicos. Como um único regulon pode conter muitos genes, os fatores sigma podem regular a expressão simultânea de maneira eficiente. RpoN está intimamente conectada com a expressão de genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio. Genes sob o controle de RpoN são expressos sob condições específicas de estresse ou quando uma única fonte de nitrogênio ou carbono está disponível (BUCK *et al.*, 2000; KAZMIERCZAK; WIEDMANN; BOOR, 2005).

A proteína TrkA é codificada em *A. brasilense* Sp245 pelo gene *trkA*. É uma proteína periférica de membrana componente do sistema Trk, um complexo de proteínas responsáveis pelo transporte de potássio pela membrana plasmática de procariotos (BOSSEMEYER *et al.*, 1989). Acredita-se que possua função regulatória no processo de transporte, possivelmente monitorando o estado redox da célula. Essa hipótese se baseia em evidências que NAD^+ é capaz de se ligar a TrkA que, por sua vez, possui similaridade de sequência com domínios ligantes de NAD^+ de outras proteínas (CORRATGÉ-FAILLIE *et al.*, 2010; SCHLOSSER *et al.*, 1993).

O potássio é vital à célula por estar envolvido no balanço osmótico e homeostase do pH, além de inibição e ativação de enzimas e promotores. A atividade do sistema Trk é regulada pelo sistema PTS^{Ntr} , que é composto por proteínas parálogas as do sistema PTS (BOSSEMEYER *et al.*, 1989; PFLÜGER-GRAU; GÖRKE, 2010). EIIA^{Ntr} é codificada em *A. brasilense* Sp245 pelo gene *AZOBR_p430053*. Em *E. coli*, quando não fosforilada, a EIIA^{Ntr} liga-se diretamente em TrkA, impedindo o fluxo de íons pelo complexo. A fosforilação do sistema PTS^{Ntr} a partir de EI^{Ntr} é regulada reciprocamente por glutamina e 2-OG por ligação destes em domínio GAF presente na proteína, sugerindo que esse mecanismo pode responder aos níveis de nitrogênio (LEE *et al.*, 2013). Além de se ligar a TrkA, EIIA^{Ntr} não fosforilada sinaliza para a expressão de outro transportador de potássio, KdpFABC, que possui maior afinidade pelo íon. Com isso, acredita-se que possa haver modulação nos níveis de potássio intracelular pelo estado de fosforilação de EIIA^{Ntr} , respondendo aos níveis de nitrogênio (especificamente glutamina) (PFLÜGER-GRAU; GÖRKE, 2010; VAN HEESWIJK; WESTERHOFF; BOOGERD, 2013).

A proteína Fosfopantotenoilcisteína Descarboxilase (CoaC)/Fosfopantotenatocisteína Ligase (CoaB) é codificada em *A. brasilense* Sp245

pelo gene *coaBC*. Essa enzima catalisa, bidirecionalmente, dois passos na biossíntese da coenzima A. Primeiramente, cisteína é combinada a 4-fosfopantotenato para formar 4-fosfopantotenoilcisteína. Por fim, este composto é descarboxilado em 4-fosfopantoteína (STRAUSS *et al.*, 2001). A coenzima A desempenha um papel vital em organismos vivos, sendo necessária como cofator para uma gama de processos celulares essenciais. Acetil-CoA e succinil-CoA, por exemplo, são intermediários chave no metabolismo energético (BEGLEY; KINSLAND; STRAUSS, 2001; LEONARDI *et al.*, 2005).

A provável hidrolase da superfamília metalo- β -lactamase é codificada em *A. brasilense* Sp245 pelo gene *AZOBR_100259*. Enzimas da superfamília da metalo- β -lactamase, apesar de herdarem o nome da enzima que hidrolisa anéis beta-lactâmicos, catalisam a hidrólise de uma ampla variedade de compostos. O gene de *A. brasilense* Sp245 apresenta domínios semelhantes ao de ribonucleases J. As ribonucleases J são equivalentes à ribonuclease E de *E. coli* em muitos organismos que não possuem essa enzima. Também fazem parte da superfamília da metalo- β -lactamase e são evolutivamente conservadas em muitos organismos procarióticos (EVEN *et al.*, 2005; MARCHLER-BAUER *et al.*, 2015). Gerhardt (2015) identificou mais três ribonucleases como potenciais alvos de interação com PII: ribonuclease PH, R e G.

Uma proteína identificada como provável transdutora de sinal histidina quinase é codificada em *A. brasilense* Sp245 pelo gene *AZOBR_p280115*. Histidinas quinases fazem parte dos chamados sistemas de transdução de sinal de dois componentes, sendo muito presentes em procariotos e, em menor número, em eucariotos (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000). Resumidamente, a histidina quinase responde a algum estímulo, ao qual está monitorando, autofosforilando-se em um resíduo de His. Esse grupo fosforil de alta energia é então transferido para o segundo componente do sistema de transdução de sinal, uma proteína regulatória. A fosforilação da proteína reguladora gera uma mudança conformacional nesta, com subsequente mudança de atividade (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000; WEST; STOCK, 2001). Em *A. brasilense*, esse gene está no mesmo operon que dois outros relacionados à quimiotaxia: *cheC* e *cheY-like* e, por isso, é possível que esteja envolvido nessa função (GERHARDT, 2015).

A Fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintase é codificada em *A. brasilense* Sp245 pelo gene *purC*. Essa enzima catalisa o oitavo passo na biossíntese

de novo de nucleotídeos púricos. Pela importância da via, suas enzimas são naturalmente alvos de produtos que impactam diretamente no crescimento celular (NELSON *et al.*, 2005).

Uma possível diguanilato ciclase e uma possível fosfodiesterase são codificadas em *A. brasilense* Sp245 pelos genes *AZOBR_140132* e *AZOBR_p1130052*, respectivamente. São enzimas envolvidas na síntese e degradação de um importante segundo mensageiro, o c-di-GMP, estando amplamente distribuídas em bactérias. Esta molécula regula um grande número de processos celulares, com destaque para a motilidade (GALPERIN; GOMELSKY, 2013; PEI; GRISHIN, 2001).

Há a possibilidade de PII interagir e controlar a atividade dessas duas enzimas, regulando a motilidade flagelar e quimiotaxia em *A. brasilense*. Essa ideia pode ser embasada pela visualização da deficiência de motilidade em mutantes *glnB* de *A. brasilense*, mesmo com aparente distribuição flagelar intacta (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996; GERHARDT, 2015).

1.3 DIGUANILATO CÍCLICO

Diguanilato cíclico (c-di-GMP) é uma molécula solúvel que atua como segundo mensageiro em bactérias (HENGGE, 2009). Os níveis intracelulares desta molécula dependem da presença e atividade de dois grupos distintos de enzimas: diguanilato ciclases (DGCs) e fosfodiesterases (PDEs) (Figura 2), ambas podendo originar-se de um número relativamente grande de genes parálogos em dado organismo, chegando a 60 genes em alguns casos (GALPERIN; GOMELSKY, 2013). As diguanilato ciclases sintetizam o c-di-GMP utilizando duas moléculas de GTP como substrato, enquanto as fosfodiesterases específicas o degradam em 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (5-pGpG), que posteriormente é reciclado em dois GMP, e ambas podem ser encontradas no citoplasma ou ancoradas à membrana plasmática (DAHLSTROM; O'TOOLE, 2017; GALPERIN; NIKOLSKAYA; KOONIN, 2001; HENGGE, 2009). Os processos celulares modulados por c-di-GMP são diversos, mas envolvem principalmente: 1) alteração entre estado sésil e móvel; 2) formação de biofilme; 3) virulência; 4) interação da bactéria com superfície abiótica ou outros organismos; 5) síntese de biomoléculas (COTTER; STIBITZ, 2007; HENGGE, 2009; SIMM *et al.*, 2004; SRIVASTAVA *et al.*, 2013; WOLFE; VISICK, 2008). O diguanilato

cíclico foi primeiramente descrito como uma molécula que ativa alostéricamente a enzima celulose sintase de *Acetobacter xylinum*, reclassificada como *Gluconacetobacter xylinus* (ROSS *et al.*, 1987). As enzimas responsáveis pela síntese e degradação do c-di-GMP estão distribuídas amplamente pelos principais filos bacterianos, tornando-o um dos principais segundos mensageiros em bactérias (GALPERIN; GOMELSKY, 2013).

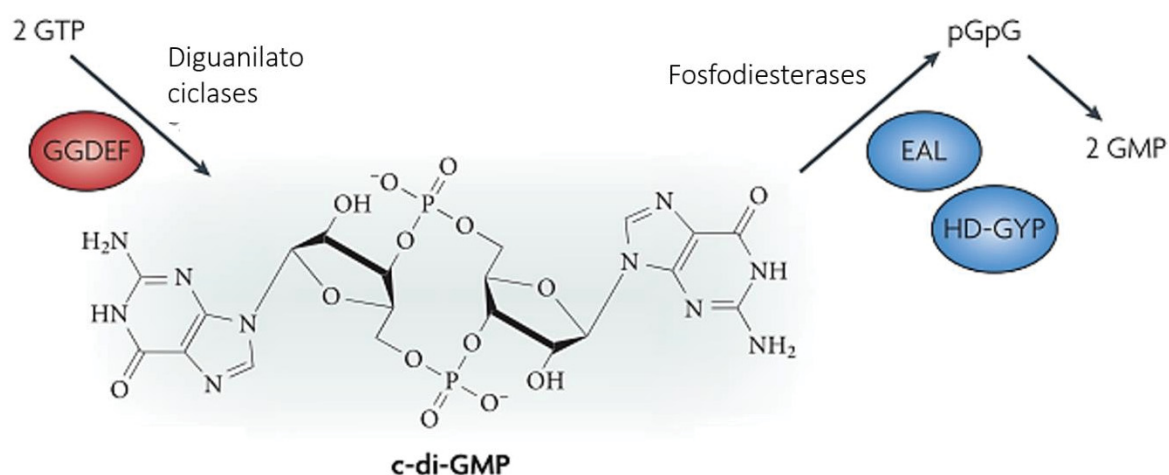


FIGURA 3 – ESTRUTURA, SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DO C-DI-GMP. A produção de c-di-GMP é controlada por diguanilato ciclases com domínios GGDEF (em vermelho) e fosfodiesterases com domínios EAL ou HD-GYP (em azul). FONTE: Adaptado de Hengge, 2009.

A estrutura do c-di-GMP foi determinada por raio-X, revelando um dímero intercalado (EGLI *et al.*, 1990). Posteriormente foi demonstrado que essa molécula apresenta polimorfismo em solução, dependente de sua concentração e da presença de íons, podendo também se apresentar em tetrâmeros e octâmeros (ZHANG *et al.*, 2006). Gentner e colaboradores (2012) descreveram um equilíbrio rápido entre a forma dimérica e monomérica de c-di-GMP, em concentrações na ordem de 1 mM, estando as formas tetraméricas e octaméricas dependentes da presença de íons monovalentes, como K^+ . Em contraste, em concentrações micromolares de c-di-GMP (mais próximas das condições fisiológicas), este se apresentou como monômero, mesmo em altas concentrações de K^+ . Portanto acredita-se que a forma monomérica do c-di-GMP seja a mais relevante no contexto de sinalização celular (GENTNER *et al.*, 2012).

O nível intracelular de c-di-GMP resulta da ação antagônica das DGCs e PDEs e pode ativar efetores, proteínas e RNA que ligam a molécula, que controlam

diferentes processos celulares (SCHIRMER; JENAL, 2009). O primeiro domínio identificado como ligante de c-di-GMP em efetores foi o domínio PilZ, presente na celulose sintase de *G. xylinus* (AMIKAM; GALPERIN, 2006). Outros efetores identificados são versões degeneradas de DGCs ou PDEs, que não apresentam atividade catalítica, porém podem atuar em processos de sinalização (SCHIRMER; JENAL, 2009). Diferentes proteínas, que não possuem domínios PilZ e que não são versões degeneradas das enzimas envolvidas na síntese e degradação de c-di-GMP, mostram-se capazes de atuar como receptores. Os fatores de transcrição VpsT de *Vibrio cholerae* e FleQ de *Pseudomonas aeruginosa* são efetores capazes de ligar c-di-GMP para regular a formação de biofilme (HICKMAN; HARWOOD, 2008; KRASTEVA *et al.*, 2010). Além disso, já foram descritas duas classes de elementos de RNA regulatórios em cis (*cis-regulatory elements*) sensíveis ao c-di-GMP que, ao ligarem esse segundo mensageiro, regulam a expressão gênica. Genes sensíveis à regulação por esses elementos regulatórios envolvendo c-di-GMP abrangem processos importantes como virulência, formação de pili, biossíntese flagelar, e síntese, degradação e sinalização de c-di-GMP (LEE *et al.*, 2010; SUDARSAN *et al.*, 2008). Essa característica de ligação a RNAs, abre a possibilidade de se encontrar novos efetores em organismos que possuem várias cópias de DGCs e PDEs, mas onde havia se identificado poucos efetores proteicos (DAHLSTROM; O'TOOLE, 2017). Apesar da possível grande variedade de DGCs e PDEs em dado organismo, muitas delas aparentam sinalizar especificamente para determinados eventos, sugerindo especificidade no processo (RÖMLING; LIANG; DOW, 2017).

1.3.1 SÍNTESE DE C-DI-GMP E SINALIZAÇÃO

As diguanilato ciclases são enzimas com domínio GGDEF responsável pela síntese de c-di-GMP a partir da condensação de duas moléculas de GTP, com a liberação de dois pirofosfatos (ROSS *et al.*, 1987; SCHIRMER, 2016). O domínio GGDEF foi originalmente descrito na enzima PleD de *Caulobacter crescentus* (Figura 3) e, na época, foi denominado como um regulador de resposta para a transição entre as fases móvel e sésil (HECHT; NEWTON, 1995). O nome GGDEF foi definido devido ao motivo altamente conservado de Gly-Gly-Asp-Glu-Phe, mas o variante GGEEF (Gly-Gly-Glu-Glu-Phe) é comum e cataliticamente ativo, e ambos coordenam a ligação ao substrato e a dois cátions divalentes para a catálise (CHAN *et al.*, 2004;

apresenta funcional (Figura 4) (RÖMLING; LIANG; DOW, 2017; SESHASAYEE; FRASER; LUSCOMBE, 2010).

Class I	292	327	359	370	434
PleD_CAUCR	DQ [■] TGLHNRRYM	DIDFF [■] KLNDTF [■] GHDIG [■] DEV [■]	RAID	RYGGEEF	TISIG
WspT_PSEAE	DGLTGLSNRRHF	DVDYFKSYNDTF [■] GHVAGDEAL	RSSD	RYGGEEF	TVSIG
STM4551_SALTY	DPLTGLYNRRGL	DIDHFKAYNDHY [■] GHMMGDQAL	RSRD	RFGGEEF	TNVTV
YdeH_ECOLI	DVLTGLPGRRVL	DIDRFKLYNDTY [■] GHLDVVL	RDYD	RYGGEEF	TVTAG
AdrA_SALTY	DGMTGVYNRRHW	DTDHFKSINDTW [■] GHDVGEAL	RGSD	RFGGDEF	RISVG
PA4332_PSEAE	DELTGLFNRRHF	DLDFHFKRINDRH [■] GHAAGDRVL	RDS	RYGGEEF	SLSVG
DgcB_CAUCR	DGLTNLANRKAF	DIDHFKGFNDTW [■] GHDVGEAL	APPR	RYGGEEF	TVSSG
CD1420_Cdif	DPLTGAYNRKYL	DLDFNFKMINDYE [■] GHNVGDKIL	NSTS	RLGGDEF	SFSYG
Pf101_4666	DALTGVA [■] NRRLM	DADHFKAFNDRH [■] GQAGDQAL	RPAD	RYGGEEF	TVSIG
XC0420_XANC8	DQLTGALNRRGF	DLDFFRRLNETH [■] GHAGDAAL	RTTD	RFGGEEF	SFSGG
VX0965_VIBCH	DPLTGLANRWSF	DIDNFKRINDSY [■] GHDVGEAL	RNKD	RFAGDEF	TVSIG
ECA3270_PECAS	DSLTSLANGLTF	DLDFKFKQINDSF [■] GHAVGDL	RDS	RRSGDEF	SCSIG
GSU1658_GEOSL	DELTGLFNRYRL	DMDHFKGVNDTH [■] GHVGEAL	REVD	RYGGDEF	TASIG
MXAN_2643	DEHTGCYNARHL	DLDFHFKSINDTH [■] GHVGEAL	QNLD	RYGGDEF	TASVG
Class II					
YciR_SALTY	DTV [■] TGLPNR [■] NAI	DLDFNFKKINDAY [■] GHMFQDQL	LEED	RLGGDEF	GCAIG
DGC1_KOMXY	DPLTGLFNRRGF	DLDFGFKQINDI [■] GHVGEAL	HPED	RLGGDEF	SGSIG
Y1354_MYCTU_Rv1354c	DDL [■] TGLHNRRAL	DLDFRLKAIN [■] DYLGHAAGDQFL	RIGD	RLGGDEF	TVSIG
Class III					
SE_0528_STAES	DYLTGLGNVKFF	DIDGFKDVNDHYS [■] QSGDAVL	PNQF	RNGGEEF	SIGVG
PopA_CAUCR	DAATGLFT [■] DLF	RVADKPETVWARQNGWLDRL	RVED	RLATEVF	EFDIG
Imo0531_LISMO	DQETLLKNIVSF	KVRHWRELKRFQSEDEMRLAL	RTSD	LLDKDEA	ELRIG
BifA_PSEAE	DFLTGLPNRQLL	GLDDFKGINEQYTYQLGDQL	RLGS	RLGGDQF	RATIG
STM2503_SALTY	DPVVHLPNRLAL	GKNYGVMLRIQYQKLSHWIT	SGHD	RLNTEAH	YLLLG
CsrD_ECOLI	DVKTGLNRLFF	RLPDFNMLSDTW [■] GHVGEAL	RYPG	RYHRSDF	MIHIG
CC3396_CAUCR	CDLTGLLD [■] RRSF	DLDFRLRLNEAL [■] GHADLV	PAQS	RIGEDEF	TLSIG
CdpA_VIBCH	SLLTASYR [■] DRR	KVTNFNQINEKYGPVGDKLL	QKLA	AIGVGEW	SISLG
YybT_BSUB	ERFIAVLNEHLL	TLSTGVGASVSSLKELGDLAQ	QVAI	FYGGKTN	GAAIG

FIGURA 5 – CLASSIFICAÇÃO DE DOMÍNIOS GGDEF BASEADA NA CONSERVAÇÃO DE SEUS MOTIVOS. Em fundo cinza estão ilustrados os aminoácidos que interagem com o substrato na GDC PleD. K332, em fundo ciano, estabiliza o estado de transição. O motivo RXXD do sítio I está em azul. Aminoácidos não convencionais que ainda conferem atividade catalítica estão em fundo azul. Em fundo verde estão os aminoácidos que dão especificidade para GMP-AMP cíclico, e as proteínas que produzem o estão com nomes em laranja. Aminoácidos conservados estão coloridos. Os nomes de proteínas GGDEF estão em preto e GGDEF-EAL em verde. Nomes de proteínas com domínios GGDEF não convencionais estão em violeta. FONTE: Adaptado de Römling, Liang e Dow, 2017.

Isoladamente, um domínio GGDEF comumente apresenta atividade subótima, necessitando de dimerização para catalisar a reação de condensação. Para que ocorra formação do produto, duas moléculas de GTP devem estar alinhadas de modo anti-paralelo e, para que isto aconteça, acredita-se que a dimerização dos domínios seja necessária (FIGURA 5) (SCHIRMER, 2016).

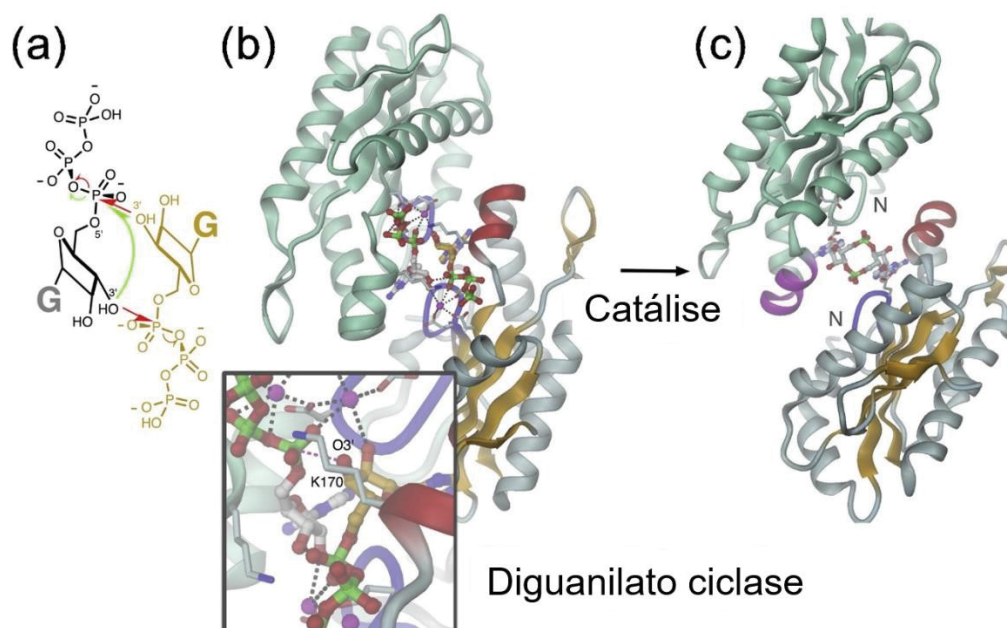


FIGURA 6 – ESTRUTURA DIMÉRICA E CATÁLISE POR DIGUANILATO CICLASES. (a) Representação das reações de ciclização de duas moléculas de GTP (setas vermelhas). (b) Provável arranjo de dois domínios GGDEF de DgcZ ligados ao GTP em uma conformação eficiente para a catálise. (c) Complexo ligado ao produto. Fonte: Adaptado de Schirmer, 2016.

A formação do homodímero e a atividade catalítica podem ser reguladas de duas formas. A primeira é pela ativação alostérica de sensores N-terminais. Apesar de muitas DGCs possuírem esses domínios sensores, poucos substratos foram identificados (DAHLSTROM; O'TOOLE, 2017). A DgcZ de *Escherichia coli* (Figura 5), por exemplo, é um dímero ativo que tem a sua atividade catalítica inibida após a ligação de íons zinco, provavelmente por interferir na estrutura dimérica, impedindo o posicionamento correto dos substratos para catálise (RÖMLING; LIANG; DOW, 2017; ZÄHRINGER *et al.*, 2013). Em *E. coli* há também a DosC e DosP, uma diguanilato ciclase e uma fosfodiesterase capazes de sensoriar oxigênio por meio de um domínio de globina modificado e um domínio PAS, respectivamente. Juntas, elas controlam os níveis de c-di-GMP em resposta aos níveis de oxigênio molecular (TUCKERMAN *et al.*, 2009). Muitas DGCs possuem domínios N-terminais PAS, que apresentam similaridade a outros domínios regulatórios sensíveis ao potencial redox ou oxigênio em proteínas, como a NifL, presente em algumas bactérias fixadoras de nitrogênio (GALPERIN; GOMELSKY, 2013; TAL *et al.*, 1998). O segundo mecanismo a controlar a formação de dímeros ativos é a inibição por retroalimentação. As DGCs possuem um sítio inibitório, denominado sítio I, que apresenta o motivo conservado RXXD, que é ativado alostéricamente pelo seu produto c-di-GMP. Esse sítio encontra-se a uma

distância de cinco aminoácidos, a montante do sítio ativo. Apesar da distância relativamente próxima em sua estrutura primária, os dois sítios encontram-se em pontos antipodais na estrutura tridimensional (FIGURA 6). Enzimas que possuem o sítio I exibem uma constante de inibição não competitiva de concentração na ordem micromolar, sugerindo que a inibição pelo produto teria como função limitar a ação do c-di-GMP a alvos próximos e específicos, evitando que esse se difunda e ative alvos não específicos (CHAN *et al.*, 2004; CHRISTEN *et al.*, 2006; GALPERIN; GOMELSKY, 2013; WASSMANN *et al.*, 2007). É importante notar que a atividade do domínio GGDEF também pode apresentar cooperatividade positiva ao substrato (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

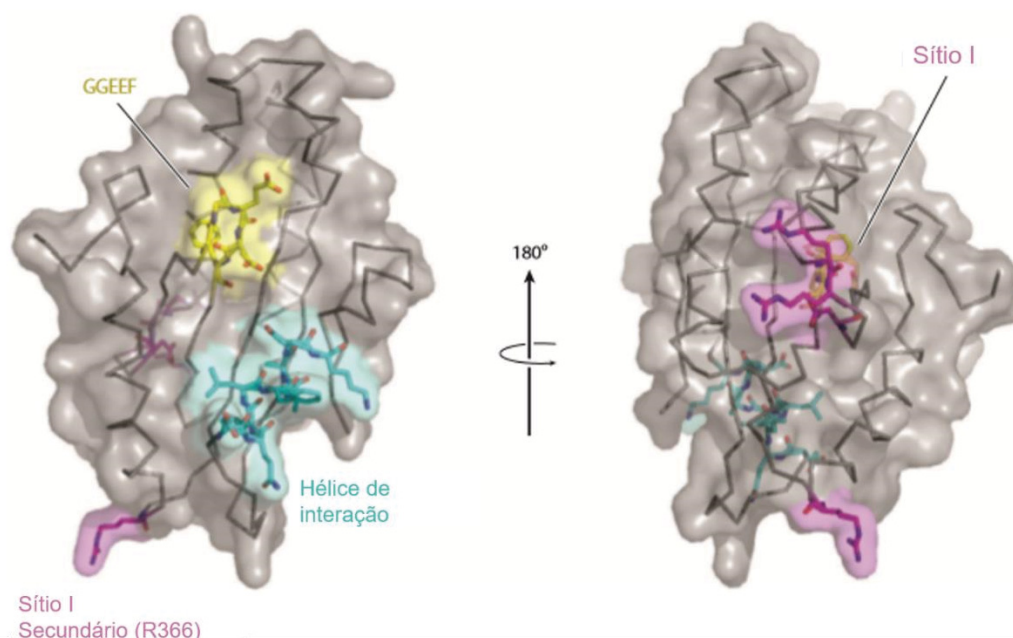


FIGURA 7 – ORGANIZAÇÃO ESPACIAL DO DOMÍNIO GGDEF. Estrutura do domínio GGDEF de GcbC. O sítio ativo com resíduos GGEEF está destacado em amarelo. Essa proteína utiliza uma hélice (em ciano) no domínio GGDEF para interagir fisicamente com sua proteína efetora, LapD. O sítio I está mostrado em roxo, na direita. Essa proteína tem, além do motivo RXXD no sítio I, o resíduo R366 que funciona como um sítio I secundário (esquerda). FONTE: Adaptado de Dahlstrom e O'Toole, 2017.

Outro mecanismo de regulação ainda não elucidado foi observado em *Vibrio cholerae* A1552, que apresenta maior formação de biofilme e acúmulo de c-di-GMP em 15 °C quando comparado a 37 °C. Foram construídos mutantes para o domínio GGDEF dos 31 genes codificadores de DGCs, presentes em seu genoma, mas somente 6 se mostraram responsáveis pelo acúmulo de c-di-GMP sensível a temperatura, por mecanismos ainda desconhecidos (TOWNSLEY; YILDIZ, 2015).

Geralmente, DGCs de um único genoma são parálogas funcionais, apresentando baixa identidade em sua estrutura primária (menor que 40%, em alguns casos), enquanto ortólogas de espécies distantemente relacionadas podem apresentar alta similaridade (GALPERIN; GOMELSKY, 2013). É notado que há uma especificidade, absoluta em alguns casos, relacionando DGCs e PDEs particulares a fenótipos característicos. Diante desse cenário, surgiu a dúvida de como essa especificidade é controlada no ambiente celular. Há duas principais hipóteses que ajudam a entender como o c-di-GMP atua sobre seus efetores: o modelo global e o modelo local (Figura 7) (DAHLSTROM; O'TOOLE, 2017).

O modelo global é explicado através da afinidade de ligação do c-di-GMP aos seus efetores, onde as múltiplas DGCs e PDEs integrariam múltiplos sinais ambientais em respostas específicas. Em *Salmonella typhimurium*, dois efetores com domínio PilZ mostraram uma diferença de afinidade de 43 vezes ao segundo mensageiro (PULTZ *et al.*, 2012). Nesse estudo, a inativação do gene *yjhH*, de uma fosfodiesterase, aumentou os níveis globais de c-di-GMP a ponto de ativar o efector com maior afinidade YcgR e inibir a motilidade, mas não a níveis suficientes para ativar BcsA, um efector de menor afinidade responsável pela síntese de celulose. Porém, ao alterar a afinidade desses efetores ao c-di-GMP através de modificações próximas ao sítio de ligação, foi demonstrada consequente alteração do fenótipo de maneira previsível. Esses autores também propõe a hipótese de que algumas DGCs produzem níveis de c-di-GMP suficientes para ativar efetores de baixa afinidade, enquanto outras, que ligam c-di-GMP ao sítio I com alta afinidade, só seriam capazes de ativar efetores de maior afinidade. Além disso, especula-se que efetores com múltiplos sítios de ligação ao c-di-GMP possam utilizar dessa sua característica para um ajuste fino de sua atividade, exercendo sua função apenas em níveis específicos de sinalização (PULTZ *et al.*, 2012). Esse modelo de sinalização global também pode ser embasado pela existência de organismos com relativamente poucas cópias de DGCs, como *Ehrlichia chaffeensis*, cuja única diguanilato ciclase é responsável pela invasão a monócitos humanos (KUMAGAI *et al.*, 2010). É observado que bactérias patogênicas obrigatórias costumam possuir muito menos cópias de DGCs e PDEs do que bactérias de vida livre, provavelmente pelas últimas necessitarem de um maior grau de controle a partir da integração de um variado número de estímulos ambientais (DAHLSTROM; O'TOOLE, 2017).

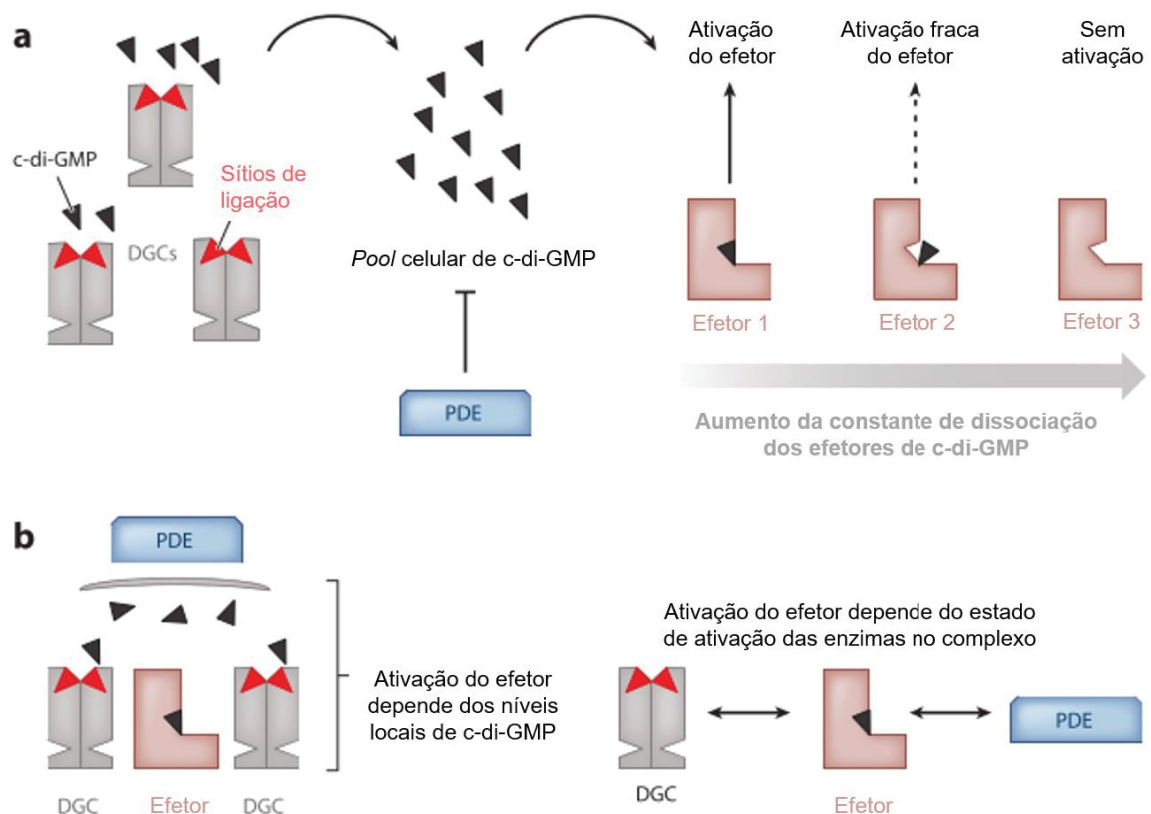


FIGURA 8 – MODELOS SOBRE A ESPECIFICIDADE NA SINALIZAÇÃO POR C-DI-GMP. (a) No modelo global, diferentes DGCs e PDEs contribuem para um nível global do segundo mensageiro. Efetores com as menores constantes de dissociação são ativados primeiro. Conforme o nível global de c-di-GMP aumenta, efetores com maiores constantes de dissociação são ativados. (b) O modelo local é proposto de duas maneiras: 1) DGCs que estão próximas, mas não necessariamente em contato podem criar um *pool* local de c-di-GMP que ativariam proteínas alvo. As PDEs teriam como função auxiliar a manter o c-di-GMP localizado, para que esse não se difunda para outros efetores (esquerda). 2) De maneira alternativa, a interação física entre DGCs, efetores e PDEs podem criar complexos. Dessa forma, o estado do efetor dependeria da presença e condições da(s) outra(s) enzima(s) no complexo. Além disso, a atividade catalítica das enzimas pode ser influenciada pela ligação aos seus efetores. Fonte: Adaptado de Dahlstrom e O'Toole, 2017.

O modelo de sinalização local tem como base a existência de interações proteína-proteína, onde uma diguanilato ciclase entregaria diretamente o c-di-GMP a seu efetor (DAHLSTROM; O'TOOLE, 2017; RÖMLING; LIANG; DOW, 2017). Um estudo de Dahlstrom e colaboradores (2016) demonstrou que a sinalização, para a formação de biofilme, entre uma diguanilato ciclase (GcbC) e sua proteína receptora (LapD) em *Pseudomonas fluorescens* é dependente não somente da produção de c-di-GMP, mas também de uma interação proteína-proteína entre as duas que é dependente de múltiplas superfícies de interação, incluindo o sítio I (Figura 6). O sítio inibitório, neste caso, teria como função não apenas modular a atividade catalítica, mas também prover especificidade na sinalização (DAHLSTROM *et al.*, 2016). Atualmente se acredita que as DGCs possuam diversas outras interfaces que

participem de interações e formem complexos macromoleculares e que disso derive a especificidade de sinalização de alguns casos. Devido a essa variedade e coexistência de diversos sítios envolvidos em uma única interação, atualmente é difícil prever a interação de DGCs e PDEs com outras proteínas. É importante mencionar que uma interação entre diguanilato ciclase e outra proteína não significa, necessariamente, que esta seja um efetor envolvido na sinalização por c-di-GMP (DAHLSTROM *et al.*, 2015; DAHLSTROM; O'TOOLE, 2017; RÖMLING; LIANG; DOW, 2017).

Apesar da existência desses dois modelos, é possível que muitas bactérias utilizem as duas formas de sinalização ao mesmo tempo e, até mesmo, para a mesma sinalização. Como no caso já citado da sinalização entre GcbC e LapD que depende de interação física para o fenótipo de acumulação de biofilme, no mesmo organismo também foi identificada outra diguanilato ciclase, GcbB, que sinaliza o mesmo fenótipo através de LapD. Porém, diferentemente de GcbC, os pesquisadores não conseguiram detectar a interação entre GcbB e LapD, abrindo a possibilidade de que essa sinalização siga o modelo proposto anteriormente, dependente dos níveis globais de c-di-GMP e da afinidade de ligação do efetor (DAHLSTROM; O'TOOLE, 2017).

Alguns domínios GGDEF degenerados e, portanto, não funcionais, ainda retêm a capacidade em ligar GTP. Dessa forma, domínios GGDEF degenerados possuem atuação sensorial e podem, se for o caso, ativar de forma alostérica a atividade de fosfodiesterase de domínios EAL associados (CHRISTEN *et al.*, 2005; TAMAYO *et al.*, 2008). Adicionalmente, já foi observada a atividade de ATPase nesses domínios não funcionais (RAO *et al.*, 2010).

1.3.2 DEGRADAÇÃO DE C-DI-GMP

As fosfodiesterase são as enzimas responsáveis pela degradação do c-di-GMP e podem ser subdivididas em dois grupos baseados na presença de um domínio que os denominam: EAL ou HD-GYP. Assim como o domínio GGDEF, o domínio EAL está amplamente distribuído entre bactérias. O domínio HD-GYP, entretanto, é menos disseminado, e até mesmo ausente em muitas espécies (HENGGE, 2009).

O domínio EAL foi o primeiro caracterizado como o responsável pela atividade específica de fosfodiesterase contra c-di-GMP. Foi observado que o produto da

hidrólise de c-di-GMP é GMP dimérico e linear, ou 5-pGpG. *In vitro*, PDEs com domínio EAL conseguem hidrolisar, muito lentamente, 5-pGpG em GMP, sugerindo que essa atividade não seja relevante *in vivo* (RÖMLING; LIANG; DOW, 2017; SCHMIDT; RYJENKOV; GOMELSKY, 2005).

PDEs EAL necessitam de cátions divalentes, comumente Mn^{2+} ou Mg^{2+} , como cofatores numa catálise com dois metais, enquanto outros cátions, como Ca^{2+} , podem inibir sua atividade. Exibem alta afinidade por c-di-GMP na faixa de concentração fisiológica (nanomolar). Apesar de ter sido demonstrado que o domínio EAL apresenta atividade em sua forma monomérica, a ligação ao substrato aumenta drasticamente sua afinidade de dimerização, indicando que esta seja a conformação funcional *in vivo* (GALPERIN; GOMELSKY, 2013; SCHMIDT; RYJENKOV; GOMELSKY, 2005; SUNDRIYAL *et al.*, 2014).

O domínio EAL compreende não somente o motivo EAL, mas também um motivo maior e conservado que é necessário para a atividade catalítica, incluindo aminoácidos para a ligação do substrato, a ligação dos íons divalentes e a catálise. Cristalizações de proteínas com domínio EAL mostram um dobramento em barril-TIM, alternando entre oito alfa hélices e oito folhas beta. Possuem uma alça flexível (denominada alça 6) que coordena a ligação ao substrato e a íons, além de facilitar a dimerização, possibilitando a catálise (GALPERIN; GOMELSKY, 2013; RAO *et al.*, 2009; RÖMLING; LIANG; DOW, 2017).

Proteínas com domínio EAL podem ser subdivididas em 3 classes: (I) enzimaticamente ativas, (II) potencialmente ativas e (III) enzimaticamente inativas. A maioria pertence a classe I, possuindo domínios N-terminais regulatórios associados e apresentam atividade subótima até a ativação e correto posicionamento da alça 6. Proteínas da classe II apresentam atividade reduzida devido a degeneração de alguns aminoácidos conservados no motivo, proteínas que contêm somente o domínio EAL estão inseridas nesta classe. A classe III compreende proteínas com domínios EAL degenerados em muitos aminoácidos essenciais para sua função, aquelas que ainda possuem a capacidade de ligar c-di-GMP podem atuar como receptores (BARENDT *et al.*, 2009; RAO *et al.*, 2009; RÖMLING; LIANG; DOW, 2017).

1.4 C-DI-GMP EM *Azospirillum brasilense*

A. brasilense é uma bactéria móvel que possui um único flagelo polar (RUSSELL *et al.*, 2013). A aerotaxia é descrita como a principal resposta comportamental desse organismo (ALEXANDRE; GREER; ZHULIN, 2000). Ao se deparar com um gradiente de oxigênio, as células de *A. brasilense* movem-se para zonas de baixa concentração de oxigênio (3 a 5 μM), onde são maximizados o seu metabolismo microaeróbico e a fixação de nitrogênio (ZHULIN *et al.*, 1996). O quimiorreceptor de membrana Tlp1 atua como um sensor energético, mediando a habilidade de *A. brasilense* navegar em gradientes de compostos que afetam os níveis energéticos intracelulares, como oxigênio (RUSSELL *et al.*, 2013). Tlp1 possui uma estrutura padrão de muitos quimiorreceptores: um domínio N-terminal ancorado na membrana voltado ao espaço periplasmático que codifica uma provável região sensorial e um domínio C-terminal citoplasmático que interage com as proteínas envolvidas na sinalização para quimiotaxia. O que foge ao padrão é a presença de um domínio PilZ, ligante de c-di-GMP, na porção C-terminal (O'NEAL *et al.*, 2017). Foi demonstrado que os níveis de c-di-GMP variam em *A. brasilense* em resposta às concentrações de oxigênio; e que Tlp1 é um efector de c-di-GMP, provavelmente modulando a motilidade em resposta aos níveis de oxigênio (RUSSELL *et al.*, 2013). Russell e colaboradores (2013) demonstraram que níveis elevados de oxigênio, em um primeiro momento, aumentam os níveis de c-di-GMP e a motilidade das células, ajudando essas a encontrarem zonas de baixa concentração de oxigênio. Caso as concentrações altas de oxigênio persistam junto à elevada concentração de c-di-GMP, as células mudam para o estado sésil, formando agregados e produzindo biofilme. Esses resultados mostram que em uma escala de tempo maior, a alta concentração de c-di-GMP está associada ao comportamento sésil; porém, numa resposta inicial, o c-di-GMP aparenta promover, ao invés de suprimir, a motilidade (RUSSELL *et al.*, 2013). Recentemente, O'Neal e colaboradores (2017) confirmaram a função de Tlp1, com evidências experimentais de que a ligação de c-di-GMP ao receptor ativa a sua sinalização durante a aerotaxia. Além disso, demonstraram que os níveis de c-di-GMP são alterados conforme o estado de metabolismo de carbono: a concentração do segundo mensageiro é maior em células cultivadas com ácidos orgânicos (malato ou succinato) do que com carboidratos (frutose) como única fonte de carbono, por exemplo. Isso indica que a sinalização por c-di-GMP pode sensoriar diferentes

estímulos, modulando a sua contribuição para permitir uma resposta mais precisa da célula ao seu estado metabólico (O'NEAL *et al.*, 2017).

Apenas duas enzimas envolvidas no metabolismo de c-di-GMP já foram caracterizadas em *A. brasilense*, apesar de que possa existir dezenas delas: CdgA e ChsA (CARREÑO-LÓPEZ *et al.*, 2009; RAMÍREZ-MATA *et al.*, 2016). CdgA é uma diguanilato ciclase envolvida na formação de biofilme e produção de exopolissacarídeos (RAMÍREZ-MATA *et al.*, 2016). ChsA é uma proteína com domínio EAL que controla a quimiotaxia, porém não está associada a um domínio GGDEF, o que suscitou dúvidas iniciais com relação à sua participação no metabolismo de c-di-GMP por ser um padrão incomum em PDEs (CARREÑO-LÓPEZ *et al.*, 2009). Mais tarde comprovou-se que ChsA é uma fosfodiesterase pois contribui para as flutuações de concentração intracelular de c-di-GMP em resposta ao oxigênio (RUSSELL *et al.*, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

As proteínas da família PII reconhecidamente desempenham importante papel no metabolismo de nitrogênio e muitas de suas funções e interações proteína-proteína estão bem descritas em procariotos. Além de sua atuação no metabolismo de nitrogênio, há evidências convincentes que também podem exercer papel regulador no metabolismo de carbono. Em 2015, Edileusa C. M. Gehardt relatou em sua tese de doutorado a identificação de diversas proteínas de *A. brasilense* como potenciais alvos de interação com PII, muitas delas integrantes e/ou reguladoras de diversas vias regulatórias, incluindo a quimiotaxia. A possibilidade de que uma diguanilato ciclase e uma fosfodiesterase interajam com PII é reforçada por mutantes *glnB* que apresentam deficiência de motilidade (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996) e pela recente observação de que a aerotaxia de *A. brasilense* responde aos níveis de c-di-GMP e possivelmente ao estado do metabolismo de carbono, onde a concentração do segundo mensageiro é maior em células cultivadas em malato ou succinato do que em frutose (O'NEAL *et al.*, 2017). Assim, se proteínas PII realmente estiverem relacionadas ao controle da atividade dessas proteínas, a comprovação dessas interações pode expandir nosso conhecimento sobre vias de regulação associadas à família PII, que se acredita ser muito mais amplo do que o cenário atual mostra. Nesse contexto, o presente trabalho busca validar novas interações proteína-proteína com PII em *A. brasilense*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e validar possíveis interações de proteínas PII com alvos proteicos, a fim de melhor compreender suas funções no metabolismo de *Azospirillum brasilense*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Construir oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação de genes codificadores de proteínas previamente identificadas como potenciais alvos de interação com proteínas PII de *A. brasilense*;
- b) Amplificar os genes e inseri-los em vetores de expressão;
- c) Transformar as construções em cepa bacteriana de expressão *Escherichia coli* BL21 (λ DE3);
- d) Obter as proteínas recombinantes em suas formas solúveis após expressão heteróloga e purificação;
- e) Validar e caracterizar as possíveis interações dessas proteínas com PII por meio de ensaios de coprecipitação *in vitro*.

4 METODOLOGIA

4.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As bactérias e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 2.

TABELA 2 – ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS

(continua)

<i>Escherichia coli</i>	Características	Referência
TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1$ <i>araD139 \Delta(araleu)7697 galU galk</i> <i>rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Thermo Fisher
BL21 (λ DE3)	<i>hsdS, gal(\lambda clts 857 ind1 Sam7 nin5</i> <i>lacUV5-T7 gene 1)</i>	Sambrook e Russell, 2001.
<i>Azospirillum brasilense</i>	Características	Referência
FP2	Nal ^r Sm ^r Estirpe selvagem, SP7 Nif+	Pedrosa e Yates, 1984
Plasmídeo	Características	Referência
pET-28a	Km ^r . Vetor de expressão, promotor T7. Cauda de polihistidina N-terminal.	Novagen
pET-29a	Km ^r . Vetor de expressão, promotor T7.	Novagen
pAHUDGC	Km ^r (pET-29a). Expressa DGC de <i>A. brasilense</i> Sp245	Este trabalho
pAHUPDE	Km ^r (pET-29a). Expressa PDE de <i>A. brasilense</i> Sp245	Este trabalho
pAHUptsl	Km ^r (pET-29a). Expressa EI de <i>A. brasilense</i> Sp245	Este trabalho
pAHUrpoNHis	Km ^r (pET-28a). Expressa RpoN de <i>A. brasilense</i> FP2 com cauda de polihistidina (6x) N-terminal	Este trabalho
pEGEIIA	Km ^r (pET-29a). Expressa EIIA ^{Ntr} de <i>A. brasilense</i> FP2	Este trabalho
pGAHisGlnZ Δ loop	Km ^r . Expressa GlnZ Δ T-loop de <i>A. brasilense</i> com cauda de polihistidina (6x) N-terminal	ARAUJO, G. T., dados não publicados.

(conclusão)

Plasmídeo	Características	Referência
pLHDK7PZHis	Cm ^r . Expressa GlnZ de <i>A. brasilense</i> com cauda de polihistidina (6x) N-terminal	Huergo <i>et al.</i> , 2006
pMSA4	Km ^r . Expressa GlnZ de <i>A. brasilense</i>	Moure <i>et al.</i> , 2012
pLMA-MLV1	Km ^r . Expressa GlnB de <i>A. brasilense</i> com cauda de polihistidina (6x) N-terminal	Huergo <i>et al.</i> , 2007

FONTE: O autor, 2018.

4.2 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO CELULAR

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) ou LB-Ágar (BROWN, 2010):

- LB: Triptona (10 g/L), Extrato de Levedura (5 g/L) e NaCl (10 g/L);
- LB-Ágar: LB + ágar (15 g/L).

A. brasilense FP2 foi cultivada em meio NFb Lactato (pH 6,5), com a seguinte composição (MACHADO *et al.*, 1991):

- MgSO₄.7H₂O (2,0 x 10⁻¹ g/L);
- NaCl (1,0 x 10⁻¹ g/L);
- CaCl₂ (2,0 x 10⁻² g/L);
- Ácido nitrilo-triacético (5,6 x 10⁻² g/L);
- FeSO₄.7H₂O (2,0 x 10⁻² g/L);
- Lactato de sódio (5,0 g/L);
- Biotina (1,0 x 10⁻⁴ g/L);
- NaMoO₄.2H₂O (2,0 x 10⁻³ g/L);
- MnSO₄.H₂O (2,35 x 10⁻³ g/L);
- H₃BO₃ (2,8 x 10⁻³ g/L);
- CuSO₄.5H₂O (8,0 x 10⁻⁵ g/L);
- ZnSO₄.7H₂O (2,4 x 10⁻⁴ g/L).

A fonte de nitrogênio utilizada foi NH₄Cl (20 mM). O meio NFb lactato sólido foi obtido com a adição de ágar na concentração de 15 g/L ao meio líquido.

Os antibióticos usados foram: canamicina (Km) 100 µg/mL, ácido nalidíxico (Nal) 20 µg/mL, cloranfenicol (Cm) 30 µg/mL e estreptomicina (Sm) 20 µg/mL. As

soluções estoque dos antibióticos foram preparadas como descrito por Sambrook e Russell (2001) e mantidas a 4°C.

As células de *A. brasilense* foram cultivadas a 30°C em meio NFb lactato líquido ou sólido suplementados com os antibióticos adequados. As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB líquido ou sólido, contendo os antibióticos apropriados, a 37°C ou 16°C. Todos os cultivos em meio líquido foram incubados sob agitação a 120 rpm. As células de *E. coli* a serem armazenadas foram centrifugadas a 13400 rpm em centrífuga MiniSpin (Eppendorf), ressuspendidas em glicerol 50% e estocadas a -20°C. Estoques de *A. brasilense* foram mantidos em meio sólido a temperatura ambiente.

4.3 AMPLIFICAÇÃO DE DNA

A reação de amplificação dos genes alvo de *A. brasilense* FP2 foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (SAIKI *et al.*, 1988). A composição de uma reação padrão está descrita na Tabela 3. Como DNA molde foi utilizado extrato celular de *A. brasilense* FP2 (cultura saturada diluída 10X em água e aquecida a 100°C por 10 minutos). Algumas concentrações e parâmetros utilizados variaram de acordo com o gene a ser amplificado.

Foram planejados oligonucleotídeos iniciadores para os genes de interesse, baseados no genoma de *A. brasilense* Sp245 (GenBank/NCBI, código de acesso 11059) (Tabela 4). Os iniciadores desenhados contêm sítios de clivagem para enzimas de restrição específicas: NdeI (senso) e BamHI ou HindIII (antisenso). Os iniciadores foram sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Inc – Iowa – US).

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DA REAÇÃO DE PCR

10x <i>Pfu</i> Buffer (200 mM Tris pH 8.8, 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 100 mM KCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1 mg/mL BSA)	1x
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	0,2 mM
Iniciador senso	10 pM
Iniciador antisenso	10 pM
DNA molde (<i>A. brasilense</i> FP2)	1 µL
<i>Pfu</i> DNA Polimerase	1 U
Volume final	25 µL

FONTE: O autor, 2018.

TABELA 4 – LISTA DOS GENES E SEUS RESPECTIVOS INICIADORES

Gene	Direção	Sequência (5' - 3')	Sítios de restrição
<i>pepA</i>	Senso	CGCCCCATATGCTCGCCACCCTGCT	NdeI
	Antisenso	CTTGTGGATCCGCTCTGTCACCCGAACCG	BamHI
<i>AZOBR_p430053</i>	Senso	GATGTCATATGATCGGTATGGTTCTGGTAACC	NdeI
	Antisenso	CGTCTGGATCCTTCATCGGGTCACCCGTC	BamHI
<i>ptsI</i>	Senso	CAAGTCATATGAAGACTGACGTTCCGG	NdeI
	Antisenso	CGAGCGGATCCTCAGCCGACGGCGTTG	BamHI
<i>coaBC</i>	Senso	CAAGTCATATGGCCGAAACATCCGTGC	NdeI
	Antisenso	CGAGCGGATCCCGTTGCGCTACGGAATG	BamHI
<i>AZOBR_140132</i>	Senso	CAATGCATATGGCGGGCGAAGAGGAT	NdeI
	Antisenso	CTGACGGATCCCGCTCAGCCGTCACCGT	BamHI
<i>AZOBR_p1130052</i>	Senso	AGGGGCATATGAGCAGCACGATCGAGC	NdeI
	Antisenso	GACGCGGATCCTTACGCCAGGCTGGGGA	BamHI
<i>AZOBR_100259</i>	Senso	ACGGCCATATGACCCATCCCGACTCCG	NdeI
	Antisenso	AAACTGGATCCCGCTTATACACGGACGAGG	BamHI
<i>AZOBR_p280115</i>	Senso	AACGCCATATGGAACCGACCGAGTTTAAGC	NdeI
	Antisenso	GAGAAGGATCCTCATCCGTTCCACTCCGC	BamHI
<i>rpoN</i>	Senso	CCCTGCATATGGCGCTCAGCCAACGC	NdeI
	Antisenso	CGACCGGATCCCGGCCCGGTTACATGCGT	BamHI
<i>trkA</i>	Senso	CAAAGCATATGAAGGTCATCGTTTGCGGAG	NdeI
	Antisenso	ACGGGAAGCTTTCAGAAGAATTCAAGCCGGACG	HindIII
<i>purC</i>	Senso	GATCTCATATGACACGACGTCGGCGCA	NdeI
	Antisenso	TGGACGGATCCTTACTGGACGGTCTTGGGG	BamHI

FONTE: O autor, 2018.

4.4 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS

Para a construção dos plasmídeos pAHUrpoNHis e pEGEIIA, os produtos de amplificação dos genes *rpoN* e *AZOBR_p430053* (proteína EIIA^{Ntr}), respectivamente, foram digeridos com as enzimas de restrição NdeI e BamHI. O gene *rpoN* amplificado e digerido foi ligado ao plasmídeo pET-28a digerido com as mesmas enzimas, designando pAHUrpoNHis. O gene *AZOBR_p430053*, amplificado e digerido, foi ligado ao plasmídeo pET-29a digerido com as mesmas enzimas, designando pEGEIIA.

Os plasmídeos pAHUDGC, pAHUPDE, pAHUptsI que contêm inserções dos genes *AZOBR_140132* (diguilato ciclase), *AZOBR_p1130052* (fosfodiesterase) e *ptsI* (Proteína PEP-fosfotransferase), respectivamente, em pET-29a, foram sintetizados pela empresa General Biosystems, Inc – North Carolina, US.

4.5 ELETROFORESE DE DNA

As análises de DNA foram realizadas em gel de agarose horizontal conforme descrito por Sambrook e Russell (2001). Os géis de agarose foram mantidos brevemente em uma solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL), lavados e o DNA foi visualizado durante exposição à luz ultravioleta. O perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema de vídeo imagem acoplado (EpiChemi II Darkroom – UVP, BioImaging Systems).

4.6 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Os plasmídeos foram purificados seguindo o protocolo de minipreparação por lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Resumidamente, 1,5 mL de um cultivo celular de *E. coli* TOP10, contendo o plasmídeo de interesse, incubado durante a noite em meio LB sob agitação a 37°C, foi centrifugado a 13400 rpm por 30 segundos em centrífuga MiniSpin (Eppendorf). As células precipitadas foram ressuspensas em 300 µL de tampão GET (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0) e lisadas com a adição de 300 µL de solução de lise (0,2 M NaOH e 1% (p/v) SDS). DNA cromossomal e proteínas foram precipitados com adição de 300 µL de solução contendo acetato de potássio 3 M pH 4,8 e ácido fórmico 1,8 M. A extração terminou com a adição de 200 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugação da amostra a 13400 rpm por 10 minutos em centrífuga MiniSpin (Eppendorf). A fase aquosa derivada da centrifugação foi coletada e a ela adicionados 0,6 volumes de isopropanol para a precipitação do DNA plasmidial. Após centrifugação a 13400 rpm por 10 minutos em centrífuga MiniSpin (Eppendorf), o sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionados 500 µL de etanol 80%. Após centrifugação da amostra por 5 minutos a 13400 rpm, o sobrenadante foi descartado, o precipitado contido no tubo seco a vácuo ou em bancada e depois ressuspendido em água ultrapura.

4.7 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO

Os plasmídeos purificados foram transformados em cepas bacterianas *E. coli* BL21 (λDE3) ou TOP10 tornadas competentes por tratamento com solução de cloreto de cálcio (0,1 M), seguindo protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001). As

células quimiocompetentes foram utilizadas imediatamente após o preparo ou estocadas em solução de cloreto de cálcio (0,1 M) e glicerol 15 %, e imediatamente armazenadas a -80°C.

Para a transformação, o plasmídeo foi incubado com as células quimiocompetentes, primeiramente no gelo por 30 minutos, e depois a 42°C por 2 minutos. Em seguida, as células foram mantidas por mais 2 minutos no gelo e, posteriormente, foi adicionado 1 mL de LB à solução. Na fase de recuperação, as células foram mantidas em estufa a 37°C por 40 minutos. Por fim, as células foram plaqueadas em meio LB-ágar suplementado com o respectivo antibiótico de seleção e as placas incubadas durante a noite a 37°C.

4.8 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM SISTEMA HETERÓLOGO

Para a expressão das proteínas recombinantes, plasmídeos contendo o gene da proteína a ser expressa (Tabela 2), foram transformados em *E. coli* BL21 (λ DE3). Uma colônia da placa derivada da transformação foi isolada e inoculada em 10 mL de meio LB suplementado com o antibiótico de seleção específico e cultivada durante a noite a 37 °C, sob agitação. Oito mililitros desse pré-inóculo foram transferidos para um frasco contendo 400 mL de meio LB suplementado com antibiótico. Nesta etapa, para a expressão das proteínas GlnZ, His-GlnZ e His-GlnB, foram adicionados ao meio LB 20 mM de NH₄Cl para desfavorecer a uridililação dessas proteínas (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996). Após o cultivo, mantido sob agitação a 37 °C, atingir a densidade óptica entre 0,4 e 0,6 medida em 595 nm, a indução da expressão das proteínas recombinantes foi realizada utilizando 0,5 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), exceto para a expressão das proteínas DGC e PDE em que a concentração foi de 0,25 mM. A indução das proteínas PII e EIIA^{Ntr} ocorreu durante 3 horas a 37 °C, enquanto para DGC, PDE e RpoN a temperatura foi de 16 °C e a indução ocorreu durante a noite. Após o período de indução, as células foram resfriadas em gelo por 15 minutos e coletadas por centrifugação por 15 minutos a 4000 x g. O precipitado foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

4.9 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS GlnB E GlnZ

A purificação das proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense* foi realizada seguindo o protocolo de Moure e colaboradores (2012). O cultivo celular derivado da

expressão (item 4.8) foi ressuspensionado em solução contendo 50 mM TrisHCl pH 8,0, 100mM KCl e 20% glicerol, e lisado por sonicação no sonicador XL2020 (Heat Systems). O extrato bruto foi então mantido em banho-maria a 70°C por 15 minutos e depois no gelo por outros 15 minutos. Esse extrato foi centrifugado a 20000 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante aplicado em coluna cromatográfica *HiTrap heparin* (GE Healthcare), pré-equilibrada com tampão A (50 mM TrisHCl pH 8,0, 100mM KCl), utilizando uma bomba peristáltica. A coluna foi lavada com tampão A e depois eluída em gradiente de KCl (100 mM a 600 mM). Frações foram coletadas, analisadas por Glicina-SDS-PAGE (Item 4.15) e as que apresentaram maior concentração e grau de pureza da proteína de interesse foram mescladas e dialisadas em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, KCl 100 mM e 10% de glicerol. As proteínas foram dosadas (Item 4.14) e alíquotas armazenadas a -20°C.

4.10 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM CAUDA DE POLIHISTIDINA

As proteínas com cauda de polihistidina N-terminal His-GlnZ, His-GlnZ Δ T-loop, His-GlnB e RpoN de *A. brasilense* foram purificadas conforme protocolo descrito a seguir. O precipitado celular obtido no Item 4.8 foi ressuspensionado em 20 mL de tampão de sonicação (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl) e as células submetidas a lise por sonicação no sonicador XL2020 (Heat Systems). A fração solúvel foi separada do precipitado após centrifugação do lisado a 20000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aplicado em coluna cromatográfica *HiTrap Chelating* (GE Healthcare) carregada com NiCl₂, acoplada a uma bomba peristáltica. Frações da purificação foram obtidas após a eluição da coluna em gradiente de imidazol (50, 100, 200, 300 e 500 mM de imidazol, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, KCl 100 mM) e analisadas por Glicina-SDS-PAGE (Item 4.15). As frações com maior concentração e grau de pureza da proteína de interesse foram mescladas e dialisadas em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, KCl 100 mM e 10% de glicerol. As proteínas foram dosadas e alíquotas armazenadas a -20°C.

4.11 URIDILILAÇÃO DE PII

A uridililação da proteína His-GlnZ foi realizada *in vitro* utilizando a enzima GlnD de *E. coli* na presença de ATP e 2-OG, para favorecer a reação, seguindo

protocolo de Araujo e colaboradores (2008). O produto desse ensaio foi chamado de His-GlnZ-UMP₃.

4.12 PURIFICAÇÃO DE EIIA^{Ntr}

O precipitado celular obtido no Item 4.8 foi ressuspensionado em 20 mL de tampão de sonicação (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl) e as células submetidas a lise ultrassônica. A fração solúvel foi separada do precipitado após centrifugação do lisado a 20000 x g por 15 minutos a 4°C.

Para padronização de um protocolo de purificação para EIIA^{Ntr}, foi realizado um ensaio de triagem com diferentes resinas cromatográficas *Sepharose Fast Flow*: *DEAE*, *Heparin*, *SP*, *Q* e *CM*. Para isso, a fração solúvel derivada da lise foi incubada junto às resinas em microtubos. Após 5 minutos de incubação e decantação da resina, o sobrenadante foi coletado e mais tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl) adicionado à resina. Após nova incubação, decantação e posterior coleta do sobrenadante, à resina foi adicionado tampão com alta concentração de sal (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1000 mM NaCl), após incubação e decantação o sobrenadante também foi coletado. O objetivo foi analisar o perfil eletroforético de cada uma dessas amostras, para identificar em qual resina a proteína EIIA^{Ntr} se ligava e era posteriormente eluída de forma responsiva à concentração de NaCl. A resina que apresentou o melhor resultado foi *DEAE*.

Para a purificação, o sobrenadante derivado da expressão foi aplicado em coluna cromatográfica *HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare) acoplada a uma bomba peristáltica. Frações da purificação foram obtidas após a eluição da coluna em gradiente de NaCl (100 a 1000 mM de NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) e analisadas por Glicina-SDS-PAGE (Item 4.15). As frações com maior concentração e grau de pureza da proteína de interesse foram mescladas e dialisadas em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, NaCl 100 mM e 10% de glicerol. As proteínas foram dosadas e armazenadas a -20°C.

4.13 PURIFICAÇÃO DE DGC E PDE

No primeiro momento, foi realizado um teste de triagem de resinas cromatográficas para purificação, de forma igual a descrita no item anterior. Como

nenhuma das resinas apresentou resultados satisfatórios, a alternativa foi realizar a precipitação com sulfato de amônio, como descrito a seguir.

O precipitado celular obtido no Item 4.8 foi ressuspendido em 20 mL de tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl) e as células submetidas a lise por sonicação no sonicador XL2020 (Heat Systems). A fração solúvel foi separada do precipitado após centrifugação do lisado a 20000 x g por 15 minutos a 4°C. As proteínas do sobrenadante foram precipitadas em diferentes percentuais de saturação de sulfato de amônio a 0°C (20% para DGC e 15% para PDE) (ENGLARD; SEIFTER, 1990). A amostra foi centrifugada por 10 minutos, 10000 x g a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspendido em tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl) e centrifugado novamente sob as mesmas condições. O precipitado foi ressuspendido em tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl, 10% glicerol). A quantidade de proteínas deste extrato celular foi dosada e as amostras armazenadas a -20°C.

4.14 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A determinação da concentração de proteínas foi realizada seguindo o método adaptado de Azul de Coomassie (BRADFORD, 1976), com o uso de reagente da Biorad®, seguindo as recomendações da fabricante. As amostras foram preparadas em microplacas de 96 poços e, para a curva padrão, foi utilizada albumina de soro bovino (BSA). A absorbância em 595 nm foi obtida em leitor de microplacas.

4.15 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

As eletroforeses de proteínas sob condições desnaturantes foram realizadas como descrito por Laemmli (1970) (Glicina-SDS-PAGE) ou Schägger (2006) (Tricina-SDS-PAGE). A concentração de acrilamida variou de 10 a 15%, dependendo do caso. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical, sob voltagem constante (150 V) e pelo tempo necessário de acordo com o tempo de retenção das proteínas analisadas. Os géis foram corados em solução contendo 0,25% Azul de Coomassie Brilhante R-250, 50% metanol e 10% ácido acético.

4.16 ENSAIOS DE INTERAÇÃO POR COPRECIPITAÇÃO *IN VITRO*

A interação entre proteínas *in vitro* foi avaliada através de coprecipitação (ou *pull-down*) (RAJENDRAN *et al.*, 2011). Esse ensaio tem como objetivo observar possíveis complexos formados por interações proteína-proteína. Baseia-se na incubação e eluição das proteínas na presença de diferentes combinações de efetores. Ao se ligar a ADP, ATP e/ou 2-OG, as proteínas PII alteram a sua conformação e isso pode, como consequência, alterar sua interação com proteínas alvo.

TABELA 5 – COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO DE INTERAÇÃO

Reagente	Concentração
Detergente	0,05%
Glicerol	10%
Imidazol	20 mM
MgCl ₂	5 mM
NaCl	100 mM
Tris-HCl pH 8,0	50 mM

FONTE: O autor, 2018.

Os ensaios foram realizados utilizando-se resina magnética de níquel MagneHis (Promega). O tampão de interação (TI) padrão está descrito na Tabela 5. Os detergentes usados foram L-DAO para os ensaios com RpoN ou EIIA^{Ntr} e Triton X-100 para os ensaios envolvendo a DGC e PDE. As concentrações dos efetores ATP, ADP e 2-OG, quando presentes, estão indicadas em cada experimento. Com o auxílio de uma estante magnética, 4,5 µL da resina foram lavados com 200 µL de TI. Em seguida, a proteína com cauda de polihistidina foi solubilizada em 400 µL de TI, em quantidade descrita em cada experimento, e incubada com a resina durante 15 minutos em temperatura ambiente. A resina foi lavada duas vezes com 200 µL de TI e a ela adicionada 400 µL de TI contendo a segunda proteína, sem cauda de polihistidina, em quantidade descrita em cada experimento. Após incubação por 15 minutos, a resina foi lavada três vezes com 200 µL de TI. O conteúdo proteico ligado à resina foi eluído em tampão de amostra (2% SDS, 10% glicerol, 0,01% azul de bromofenol, 0,0625M Tris-HCl pH 6,8, 5% β-mercaptoetanol (adicionado no momento do uso)), aquecido a 100 °C por 3 minutos e submetido a eletroforese sob condições desnaturantes (Item 4.15).

5 RESULTADOS

A proposta desse trabalho foi validar a potencial interação de algumas proteínas de *A. brasilense* com as proteínas PII, GlnZ e/ou GlnB. Dentre aquelas 125 proteínas identificadas por Gerhardt (2015) como apresentando interação com GlnZ, foram escolhidas 11 proteínas (Tabela 1) com diversas funções celulares. A estratégia de validação da interação envolveu a amplificação e clonagem dos genes codificadores em vetor de expressão e ensaios de interação das proteínas expressas com proteínas PII por coprecipitação (*pull-down*).

5.1 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DE GENES SELECIONADOS

Para amplificação dos genes codificadores foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores, baseados no genoma de *A. brasilense* Sp245, contendo sítios de restrição que permitissem a clonagem dos fragmentos (Tabela 4). Dos onze genes selecionados, oito foram amplificados com sucesso pela reação em cadeia da polimerase, utilizando DNA molde de *A. brasilense* FP2 para a amplificação (Item 4.3) e estão listados na Tabela 6. Na Figura 8 está mostrado, como exemplo, o resultado da amplificação do gene *rpoN* de *A. brasilense* FP2, que possui 1578 pb. O amplificado apresenta-se em banca única. O mesmo perfil eletroforético foi observado nos demais ensaios de amplificação positiva. Os fragmentos de DNA resultantes das amplificações de *rpoN* e *AZOBR_p430053* (EIIA^{Ntr}) foram clonados no vetor pET-28a e pET-29a, respectivamente. Em face da dificuldade de clonar os fragmentos amplificados dos genes *AZOBR_140132* (provável diguanilato ciclase, domínio GGDEF) e *AZOBR_p1130052* (provável diguanilato ciclase/fosfodiesterase com domínio PAS/PAC), os clones referentes a esses foram sintetizados com otimização de códons para expressão em *E. coli* BL21 (λ DE3), baseando-se no genoma de *A. brasilense* Sp245, pela empresa General Biosystems, North Carolina - US. A construção contendo o gene *ptsI* de *A. brasilense* Sp245 (Proteína PEP-fosfotransferase) também foi sintetizada comercialmente, porém a proteína expressa se mostrou insolúvel, diferentemente da diguanilato ciclase e da fosfodiesterase.

TABELA 6 – LISTA DE GENES AMPLIFICADOS

Gene	Proteína	Amplificado
<i>AZOBR_100259</i>	Provável hidrolase da superfamília metalo- β -lactamase	Sim
<i>AZOBR_140132</i>	Provável diguanilato ciclase, domínio GGDEF	Sim
<i>AZOBR_p1130052</i>	Provável Diguanilato ciclase/fosfodiesterase com domínio PAS/PAC	Não
<i>AZOBR_p280115</i>	Provável transdutora de sinal histidina quinase	Sim
<i>AZOBR_p430053</i>	Sistema permease PTS (IIAMan)/proteína regulatória de nitrogênio IIA (EIIANtr)	Sim
<i>coaBC</i>	Fosfopantotenoilcisteína descarboxilase (CoaC) fosfopantotenatocisteína ligase (CoaB)	Sim
<i>pepA</i>	Leucina aminopeptidase	Sim
<i>ptsI</i>	Proteína PEP-fosfotransferase	Não
<i>purC</i>	Fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintase	Não
<i>rpoN</i>	RpoN (Fator Sigma 54 da RNA polimerase)	Sim
<i>trkA</i>	TrkA	Sim

FONTE: O autor, 2018.

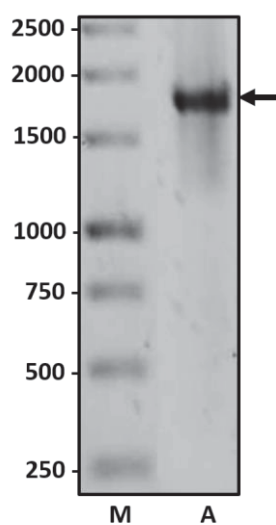


FIGURA 9 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *rpoN*. Eletroforese em gel de agarose (1%) do amplificado do gene *rpoN* de *A. brasilense* pelo método da reação em cadeia da polimerase. Linha M: marcadores de tamanho molecular (em pb). Linha A: produto de PCR com 1578 pb (seta). FONTE: O autor, 2018.

A partir desta etapa, o trabalho de investigação da interação de proteínas com proteínas PII ficou restrita a quatro genes clonados em vetores de expressão: pAHUrpoNHis (pET-28a::*rpoN*), pEGEIIA (pET-29a::*AZOBR_p430053*), pAHUDGC (pET-29a::*AZOBR_140132*) e pAHUPDE (pET-29a::*AZOBR_p1130052*). Os plasmídeos recombinantes pAHUrpoNHis e pEGEIIA foram transformados

individualmente em *E. coli* TOP10 (Item 4.7) para amplificação *in vivo*, purificação do DNA plasmidial (Item 4.6) e confirmação da clonagem. O DNA plasmidial obtido foi digerido com enzimas de restrição NdeI e BamHI para liberação do DNA inserto e visualização dos fragmentos por eletroforese. Como exemplo, na Figura 9 observa-se na linha B o fragmento correspondente ao gene *rpoN* (1578 pares de bases) de *A. brasilense* liberado pela clivagem do plasmídeo pAHUrpoNHis com as enzimas NdeI e BamHI.

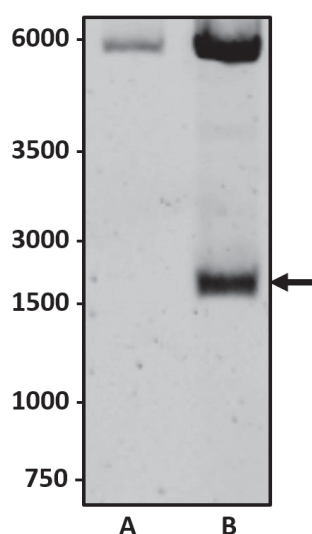


FIGURA 10 – DIGESTÃO DO PLASMÍDEO pAHUrpoNHis. Eletroforese em gel de agarose (1%) da digestão de plasmídeo pAHUrpoNHis contendo o gene *rpoN* de *A. brasilense* com as enzimas NdeI e BamHI. Os marcadores de tamanho molecular estão indicados à esquerda em pb. Linha A: plasmídeo pET-28a purificado e linearizado após clivagem com NdeI e BamHI. Linha B: amostra da digestão do plasmídeo contendo o gene *rpoN* (seta). FONTE: O autor, 2018.

As proteínas RpoN, EIIA^{Ntr}, DGC e PDE de *A. brasilense* foram expressas e purificadas para ensaios de interação com as proteínas PII.

5.2 RpoN

A proteína RpoN é codificada em *A. brasilense* pelo gene *rpoN*. Genes com a expressão sob o controle desse fator de transcrição são transcritos quando uma única fonte de nitrogênio ou carbono está disponível (ZHANG; BUCK, 2015). As proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense*, por exemplo, tem sua expressão controlada pela proteína NtrC, que quando fosforilada (em condições de fixação de nitrogênio), atua como ativadora de transcrição de diversos promotores do tipo sigma 54 (DE ZAMAROCZY, 1998). Nos ensaios de Gerhardt (2015), essa proteína apareceu como

potencial ligante de GlnZ. Naquela oportunidade, a interação foi incubada com ATP e a eluição ocorreu com ATP + 2-OG. Na eluição, a proteína se mostrou 32 vezes mais concentrada do que no controle.

5.2.1 Expressão e purificação de RpoN

A expressão de RpoN de *A. brasilense* foi induzida conforme descrito no Item 4.8, após a transformação do plasmídeo pAHUrpoNHis em *E. coli* BL21 (λ DE3) (Item 4.7). A purificação das proteínas contendo cauda de polihistidina N-terminal foi realizada em coluna cromatográfica de níquel, segundo Item 4.10. Na Figura 10, observa-se que a maior parte da proteína foi eluída em sua forma solúvel entre as frações 5 a 9. Em termos qualitativos, essas frações foram consideradas satisfatórias para os ensaios de coprecipitação.

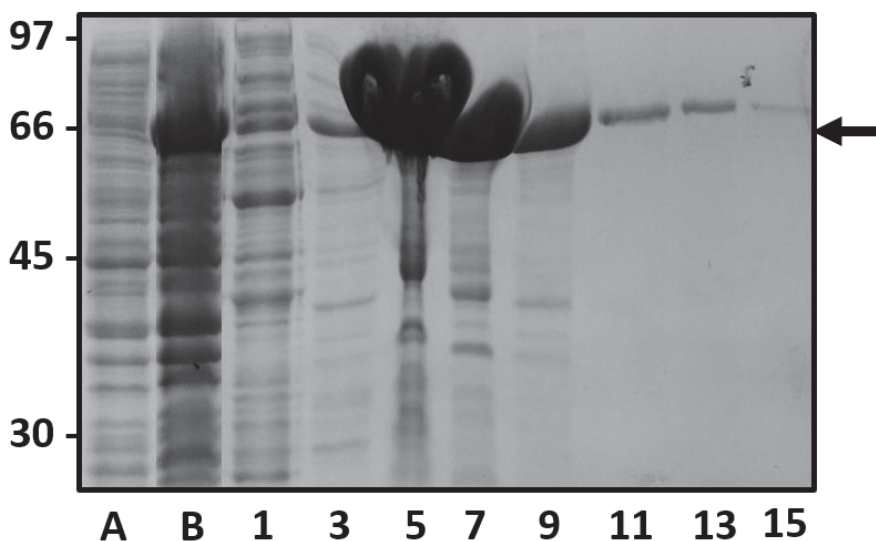


FIGURA 11 – EXPRESSÃO DE RpoN DE *A. brasilense*. A expressão e purificação da proteína recombinante em *E. coli* BL21(DE3) foi analisada por Glicina-SDS-PAGE 10% sob condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. A expressão foi induzida por 0,5mM de IPTG (Item 4.8) e a purificação foi realizada em coluna cromatográfica de níquel (Item 4.10). Linha A: proteínas do lisado celular antes da indução por IPTG. B: proteínas não capturadas pela coluna de níquel. 1-15: frações obtidas durante a purificação com gradiente de imidazol (10-500mM). Os marcadores de tamanho molecular estão indicados à esquerda em kDa. A presença da proteína RpoN, com tamanho aproximado de 58 kDa, é indicada pela seta. Fonte: O autor, 2018.

5.2.2 Ensaio de interação entre as proteínas GlnZ e RpoN por coprecipitação

Para o ensaio de coprecipitação foram utilizadas as proteínas RpoN com cauda de polihistidina N-terminal e GlnZ de *A. brasilense*. O ensaio foi realizado na presença de ATP ou de ADP (Item 4.16). Nas condições testadas, não foi observada

a banda referente a GlnZ, indicando que não houve interação *in vitro* entre RpoN e GlnZ (Figura 11).

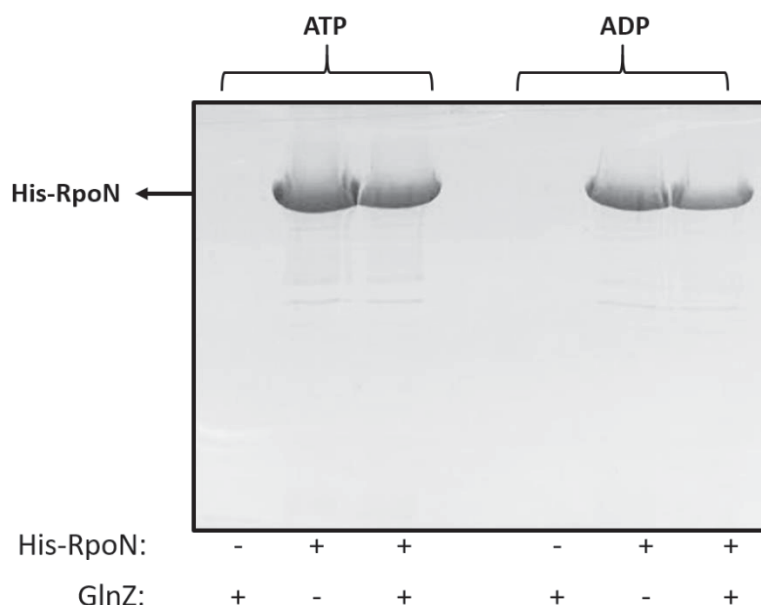


FIGURA 12 – INVESTIGAÇÃO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO ENTRE RpoN E GlnZ. A interação foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença dos efetores indicados na concentração de 1 mM. O sistema de interação consistiu de 400 µl de tampão de interação contendo His-RpoN purificada (20 µg) e/ou GlnZ purificada (40 µg) e foi incubado durante 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Glicina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

5.3 EIIA^{Ntr}

EIIA^{Ntr} é codificada em *A. brasilense* pelo gene *AZOBR_p430053*. O estado de fosforilação do sistema Pts^{Ntr} em *E. coli* e, consequentemente de EIIA^{Ntr}, é dependente de 2-OG (promove a fosforilação) e de glutamina (inibe a fosforilação) (LEE *et al.*, 2013). A fosforilação de EIIA^{Ntr} parece ser essencial para a regulação de alguns processos celulares, como o transporte de potássio (PFLÜGER-GRAU; GÖRKE, 2010). Primeiramente descrito em *E. coli*, o gene *ptsN* (que codifica para EIIA^{Ntr}) está presente no mesmo operon que *rpoN* (POWELL *et al.*, 1995). Nos ensaios de Gerhardt (2015), essa proteína apareceu como potencial ligante de GlnZ na presença de ATP. Na eluição, a proteína se mostrou 16 vezes mais concentrada do que no controle.

5.3.1 Expressão e purificação de EIIA^{Ntr}

A expressão da proteína EIIA^{Ntr} de *A. brasilense* aconteceu após a transformação do plasmídeo pEGEIIA em *E. coli* BL21 (λ DE3) e foi induzida seguindo protocolo descrito no Item 4.8. Seguindo a purificação descrita no Item 4.12, a proteína recombinante foi eluída em gradiente de NaCl, sendo obtida em sua forma solúvel e em grau de pureza suficiente para os ensaios de coprecipitação (Figura 12).

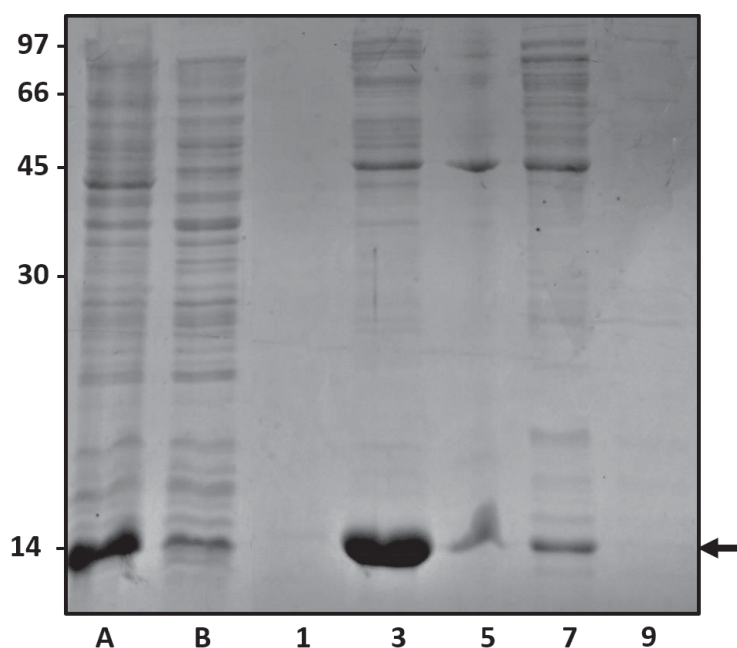


FIGURA 13 – EXPRESSÃO DE EIIA^{Ntr} DE *A. brasilense*. A expressão e purificação da proteína recombinante em *E. coli* BL21(DE3) foi analisada por Glicina-SDS-PAGE 10% sob condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. A expressão foi induzida por 0,5mM de IPTG (Item 4.8) e a purificação foi realizada em cromatográfica DEAE (Item 4.12). Linha A: proteínas solúveis após expressão, lise e centrifugação das células. B: proteínas não capturadas pela coluna cromatográfica. Outras frações em seguida obtidas durante a purificação com gradiente de NaCl (100-1000mM). Os marcadores de tamanho molecular estão indicados à esquerda em kDa. A presença da proteína EIIA^{Ntr}, com tamanho aproximado de 14 kDa, é indicada pela seta. Fonte: O autor, 2018.

5.3.2 Ensaio de interação entre as proteínas EIIA^{Ntr} e GlnZ por coprecipitação

A possível interação entre EIIA^{Ntr} e GlnZ com cauda de polihistidina N-terminal de *A. brasilense* foi avaliada *in vitro*. O ensaio foi realizado na presença de ATP ou de ADP e na presença de ATP+ 2-OG (Item 4.16). Nas três situações experimentais não foi observada a banda referente a proteína EIIA^{Ntr}, indicando que não houve interação *in vitro* entre as proteínas EIIA^{Ntr} e GlnZ (Figura 13).

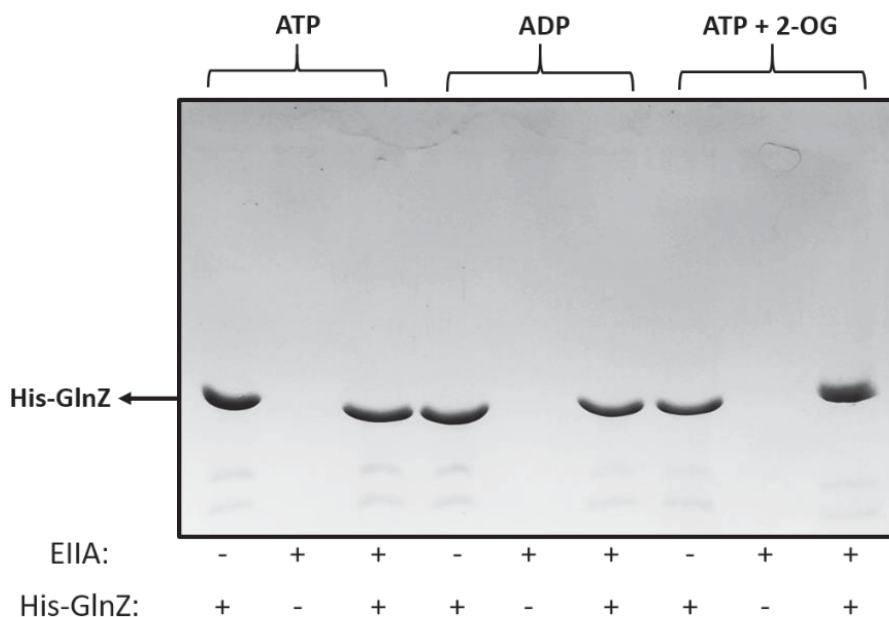


FIGURA 14 – INVESTIGAÇÃO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO ENTRE EIIA^{Ntr} E GlnZ. A interação foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença dos efetores indicados na concentração de 1 mM. O sistema de interação consistiu de 400 µl de tampão de interação contendo His-GlnZ purificada (15 µg) e/ou EIIA^{Ntr} purificada (30 µg) e foi incubado durante 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Glicina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

5.4 DIGUANILATO CICLASE

O gene *AZOBR_140132* de *A. brasilense* Sp245 está anotado no banco de dados UNIPROT como *Putative diguanylate cyclase, GGDEF domain*, uma provável diguanilato ciclase com domínio GGDEF (UNIPROT CONSORTIUM, 2018). A análise da sequência de aminoácidos revelou que a proteína de 345 aminoácidos possui o motivo conservado GGEEF no domínio GGDEF, que foi o único predito através de análise no Pfam (Figura 14) (FINN *et al.*, 2016). A proteína expressa a partir desse gene será, neste trabalho, referenciada como Diguanilato Ciclase (DGC).

(A)

10	20	30	40	50
MAGEEDFETA	RILAVRAMDR	IDANGLLPNP	ENFTLWYAYF	GGQNPDLTRA
60	70	80	90	100
IELAQRDGAT	LSQSHCDELY	KRFFTLDAEA	QAIRETSERA	RVALGRILDQ
110	120	130	140	150
LGSVGSETDR	YGQALAGFRG	ELDQPMSLAE	LRAMVAAIAA	ETTAIADRQT
160	170	180	190	200
RLQSQLEESS	QQLAELRVVL	DSARRE	AMTD	GLTGIANRRG
210	220	230	240	250
DAAQTGLPMT	LLMVDIDHFK	RFNDTHGHLV	GDHVLKLVAK	VLTEGVKGRD
260	270	280	290	300
TVARY	GGEEF	SVILPHTALA	NAIKLAEQLR	ASVGSRQIIN
310	320	330	340	
TLSVGAAEYR	PGEDLLALMR	RADEALYTAK	RGGRNR	VCAE ATVTG

(B)



FIGURA 15 – SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E ORGANIZAÇÃO DE DOMÍNIOS DA DIGUANILATO CICLASE (DGC) DE *A. brasilense* Sp245. (A) Sequência de aminoácidos da proteína DGC. Em fundo verde estão os aminoácidos do domínio GGDEF. Em amarelo está destacado o motivo GGEEF. (B) Representação gráfica da localização do domínio GGDEF na sequência de aminoácidos (barra cinza). FONTE: O autor, 2018.

Com o auxílio da ferramenta *ScanProsite* (GASTEIGER *et al.*, 2003), foram identificadas 21 sequências no genoma de *A. brasilense* Sp245 (WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2011) de prováveis diguanilato ciclases contendo o domínio GGDEF (funcional ou não) não associados à domínios EAL, sendo a DGC deste trabalho uma delas.

No trabalho de Gerhardt (2015), a DGC apareceu como possível ligante de GlnZ na presença de ATP. Comparada com o controle, na eluição na presença de GlnZ, a proteína se mostrou 16 vezes mais concentrada.

5.4.1 Expressão da Diguanilato Ciclase

O plasmídeo pAHUDGC foi transformado em *E. coli* BL21 (λ DE3), conforme Item 4.7, e a expressão induzida com IPTG (Item 4.8). Na Figura 15 observa-se que a proteína foi superexpressa em forma solúvel nas condições experimentais.

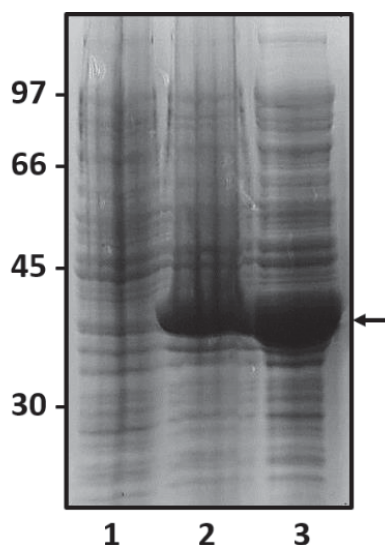


FIGURA 16 – EXPRESSÃO DE DGC DE *A. brasilense*. A expressão da proteína recombinante em *E. coli* BL21(DE3) foi analisada por Glicina-SDS-PAGE 10% sob condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. Os marcadores de tamanho molecular estão indicados à esquerda em kDa. Linhas 1 e 2: extrato celular de *E. coli* BL21(DE3) possuindo o plasmídeo pAHUDGC antes (0h) e depois (20h) da indução da expressão com 0,25 mM de IPTG a 18°C, respectivamente. Linha 3: a proteína DGC aparece solúvel na altura de 37 kDa (seta) no sobrenadante após lise e centrifugação das células. FONTE: O autor, 2018.

Para a purificação da proteína DGC, foram testadas as resinas de cromatografia *Sepharose Fast Flow: DEAE, Heparin, SP, Q e CM*. Nenhuma das resinas empregadas apresentou resultados satisfatórios na purificação da diguanilato ciclase. Dessa forma, os ensaios de coprecipitação, descritos a seguir, foram realizados com o extrato celular derivado da precipitação com sulfato de amônio (Item 4.13), que foi uma alternativa à purificação por cromatografia de afinidade.

5.4.2 Ensaios de interação por coprecipitação

Para avaliar a interação da DGC com GlnZ de *A. brasilense*, foi realizada uma análise inicial por coprecipitação das duas proteínas na presença de diferentes efetores (ATP, ADP e ATP + 2-OG) na concentração de 1 mM. Na Figura 16 observa-se as proteínas DGC e His-GlnZ eluídas da resina magnética de níquel em ensaios de coprecipitação realizados na ausência de efetores e na presença de ATP ou ADP. Esses resultados indicam a formação de um complexo entre DGC e His-GlnZ nessas condições. Porém, quando 2-OG foi adicionado com o ATP, não foi observada a banda referente a proteína DGC, indicando a ausência do complexo His-GlnZ/DGC, provavelmente por uma alteração conformacional da proteína PII provocada pela ligação de 2-OG.

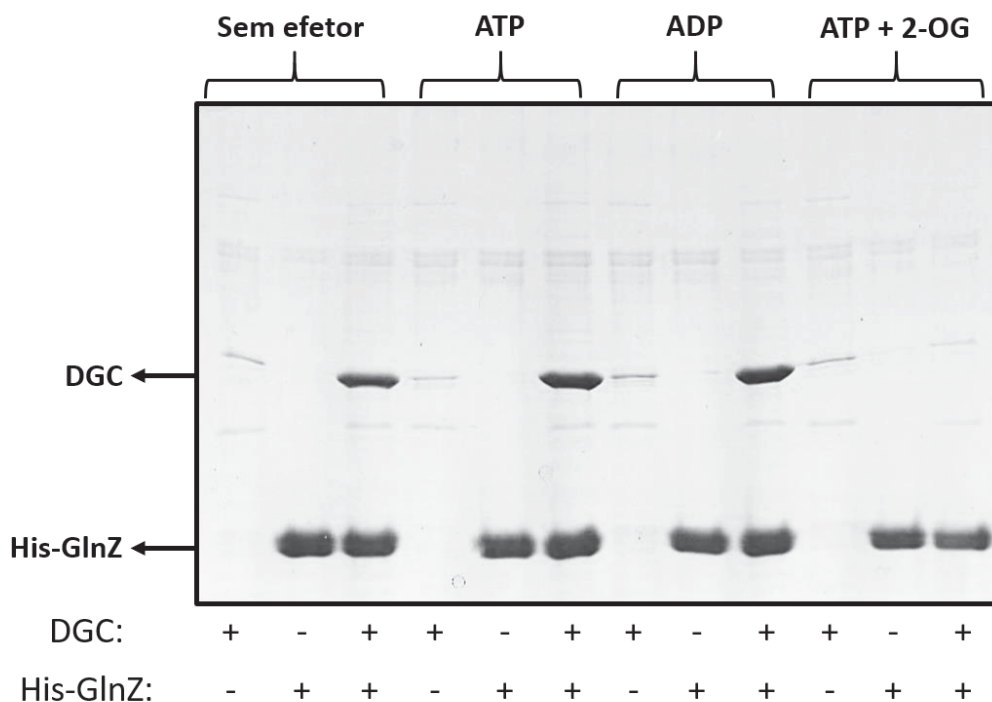


FIGURA 17 – FORMAÇÃO DE COMPLEXO ENTRE GlnZ E DGC *IN VITRO*. A formação do complexo foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença dos efetores indicados na concentração de 1 mM. O sistema de interação consistiu de 400 µl de tampão de interação contendo His-GlnZ purificada (15 µg) e/ou extrato celular da superexpressão de DGC (30 µg) e foi incubado durante 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Tricina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

Com o objetivo de elucidar a influência da presença de 2-OG na interação entre His-GlnZ e DGC, foi realizado um novo ensaio de coprecipitação. Todas as amostras continham 1 mM ATP, porém concentrações crescentes de 2-OG (Figura 17). Foi possível observar uma diminuição na intensidade da banda referente a DGC em concentrações baixas de 2-OG, como 0,01 mM, quando comparada com a coprecipitação sem 2-OG. Em concentrações de 2-OG maiores que essa, a quantidade de DGC coprecipitada com His-GlnZ é muito similar à do controle sem PII, e substancialmente diferente da quantidade de DGC coprecipitada sem 2-OG. Esses resultados sugerem que concentrações do efetor 2-OG iguais ou superiores a 0,1 mM são suficientes para impedir a formação do complexo entre DGC e His-GlnZ.

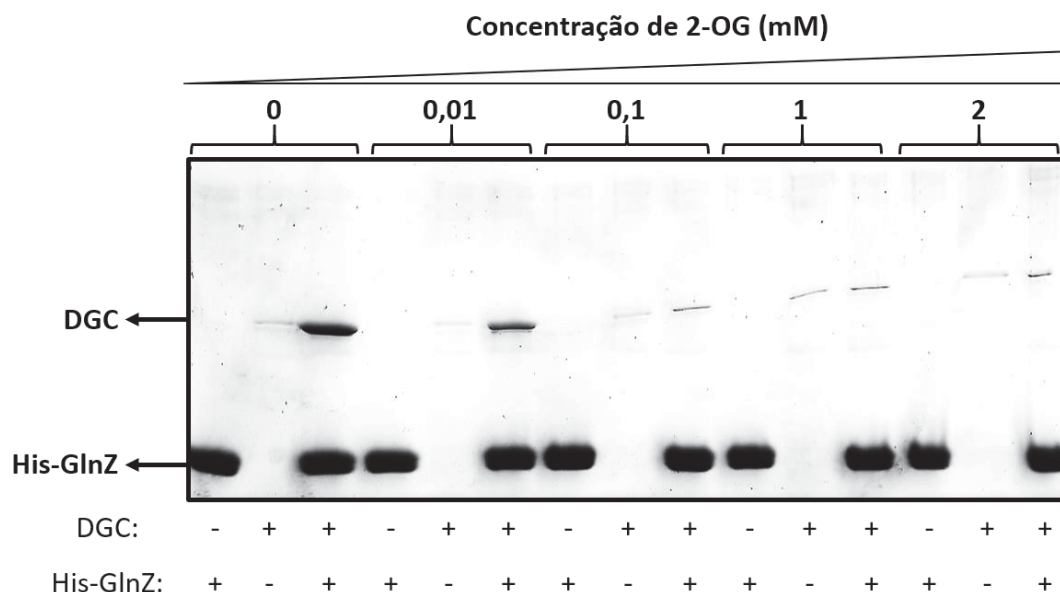


FIGURA 18 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE 2-OG NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO GlnZ/DGC *IN VITRO* NA PRESENÇA DE ATP. A formação do complexo foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença de 1 mM ATP e concentrações indicadas de 2-OG. O sistema de interação consistiu de 400 μ L de tampão de interação contendo His-GlnZ purificada (10 μ g) e/ou extrato celular da superexpressão de DGC (20 μ g) e foi incubado por 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Tricina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

O próximo experimento visava observar se a ação do 2-OG era dependente do ATP ou também ocorria na presença de ADP. Observou-se que a quantidade de proteína DGC que coprecipitou com His-GlnZ foi menor na presença de 1 mM 2-OG (Figura 18). Esse resultado pode indicar que o efeito negativo de 2-OG na formação do complexo DGC/ His-GlnZ independe do efector utilizado *in vitro*.

Como ensaios de atividade de diguanilato ciclasas necessitam da presença de íons divalentes, como Mg^{2+} (STELITANO *et al.*, 2013), foi investigada se a ausência desse íon poderia interferir na formação do complexo His-GlnZ/DGC. Na Figura 19 observa-se que houve formação do complexo na presença ou ausência de Mg^{2+} .

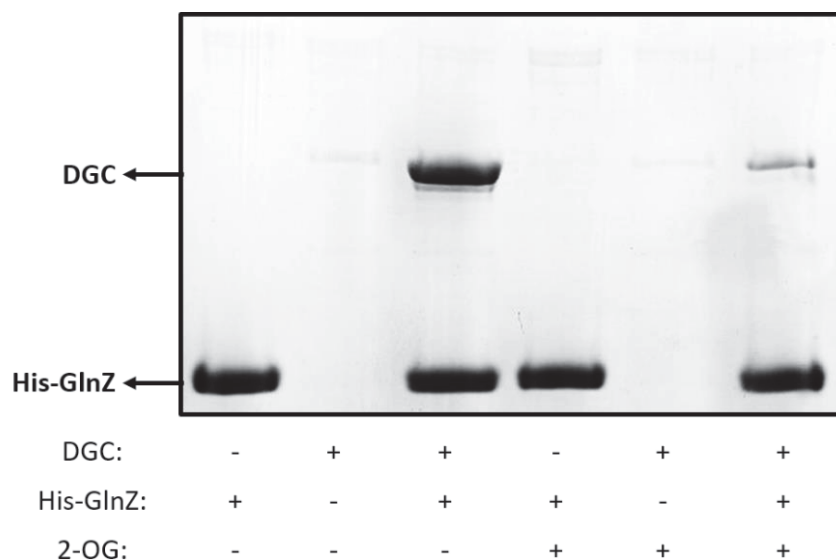


FIGURA 19 – EFEITO DO 2-OG NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO GlnZ/DGC *IN VITRO* NA PRESENÇA DE ADP. A formação do complexo foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença de 1 mM ADP e presença ou ausência de 1 mM 2-OG. O sistema de interação consistiu de 400 μ L de tampão de interação contendo His-GlnZ purificada (15 μ g) e/ou extrato celular da superexpressão de DGC (30 μ g) e foi incubado por 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Tricina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

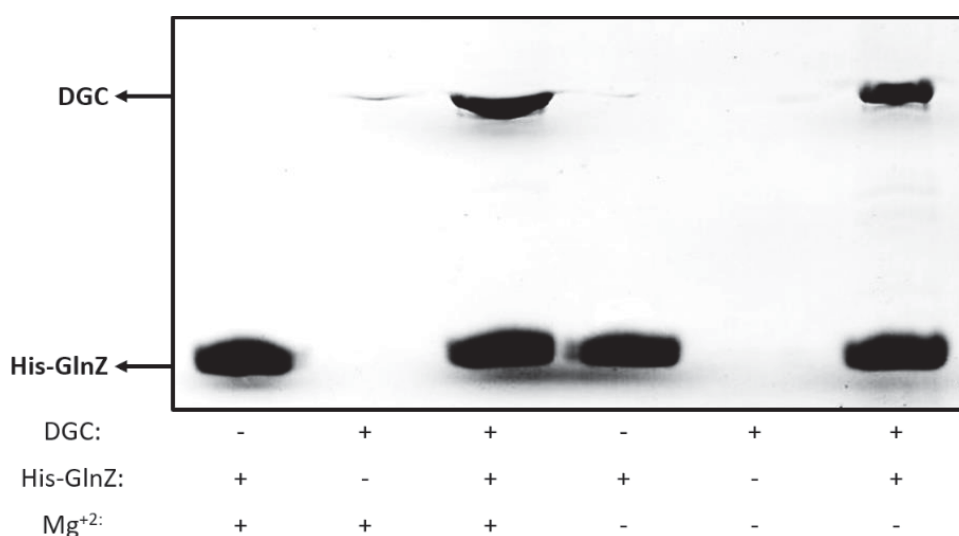


FIGURA 20 – EFEITO DE Mg⁺² NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO GlnZ/DGC *IN VITRO*. A formação do complexo foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença de 1 mM ATP e presença ou ausência de Mg⁺² no TI. O sistema de interação consistiu de 400 μ L de tampão de interação contendo His-GlnZ purificada (15 μ g) e/ou extrato celular da superexpressão de DGC (30 μ g) e foi incubado por 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Tricina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

Uma vez que a região da alça-T é quem sofre maiores alterações conformacionais com a troca de efetores e é uma região envolvida em grande parte das interações já descritas para PII, foram realizados ensaios para investigar se a

região da alça-T interfere na formação do complexo. Foi realizado um ensaio de coprecipitação com a variante His-GlnZ Δ T-loop, que não possui os aminoácidos 42 a 54. Nota-se a ausência da banda referente à proteína DGC indicando que não houve formação de complexo His-GlnZ Δ T-loop/DGC nas condições testadas (Figura 20). Esse resultado mostra que a presença da alça-T é importante para a interação física entre His-GlnZ e DGC, seja por ser o sítio de interação ou por sua importância ao estabilizar a correta conformação de PII, permitindo assim a formação do complexo.

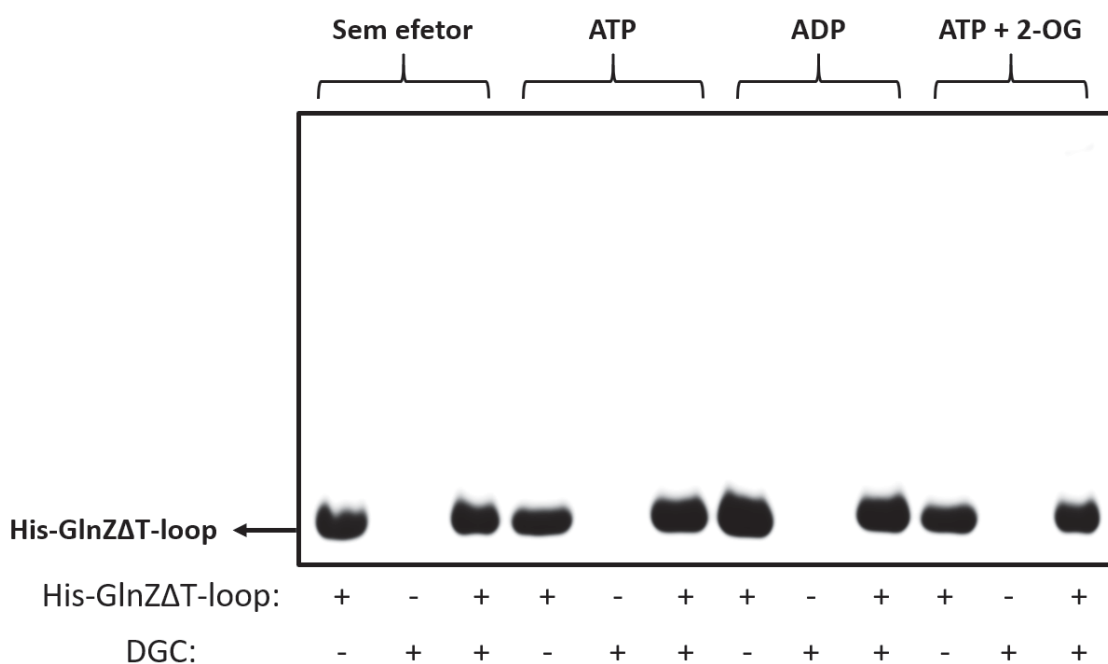


FIGURA 21 - EFEITO DA AUSENCIA DA ALÇA-T NA INTERAÇÃO ENTRE GlnZ E DGC. A formação do complexo foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença dos efetores indicados na concentração de 1 mM. O sistema de interação consistiu de 400 μ L de tampão de interação contendo His-GlnZ Δ T-loop purificada (15 μ g) e/ou extrato celular da superexpressão de DGC (30 μ g) e foi incubado por 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Tricina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

Uma vez que a estrutura da alça-T aparenta ser importante para a formação do complexo His-GlnZ/DGC, foi avaliado se a uridililação de PII, que ocorre nessa estrutura, interferiria na interação. A eluição concomitante das proteínas His-GlnZ-UMP₃ e DGC (Figura 21) indica que houve formação do complexo estável, na presença dos efetores ATP e ADP, da mesma forma que o observado para a proteína His-GlnZ não uridililada (Figura 16). Conclui-se então que a uridililação de PII não interfere na interação entre His-GlnZ e DGC.

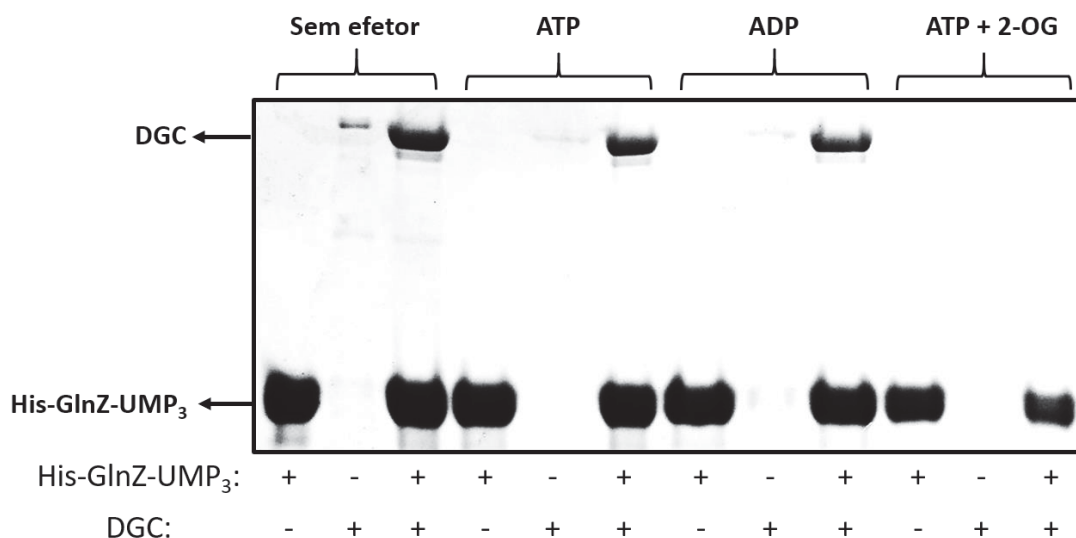


FIGURA 22 – FORMAÇÃO DE COMPLEXO ENTRE GlnZ-UMP₃ E DGC *IN VITRO*. A formação do complexo foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença dos efetores indicados na concentração de 1 mM. O sistema de interação consistiu de 400 µL de tampão de interação contendo His-GlnZ-UMP₃ purificada (15 µg) e/ou extrato celular da superexpressão de DGC (30 µg) e foi incubado por 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Tricina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

Por fim, foi averiguado se a DGC também seria capaz de interagir com a outra proteína PII de *A. brasilense*, GlnB. Foi realizado um ensaio de coprecipitação com His-GlnB e DGC na presença de ATP, ADP e ATP + 2-OG (Figura 22). Mesmo que a padronização da concentração de proteínas neste ensaio não esteja satisfatória, devido à inconstância da ligação de His-GlnB à resina, observa-se a formação de um complexo que parece ser menos estável do que aquele formado por DGC e His-GlnZ (Figura 16). Além disso, o ensaio de coprecipitação sugere que o complexo His-GlnB/DGC só é formado na presença de ATP. Novamente, a adição de 2-OG junto com ATP é desfavorável à formação do complexo. Provavelmente a interação de DGC com GlnB ocorra com menor afinidade do que com GlnZ, sendo menos estável e, por isso, pequenas alterações conformacionais induzidas pela ligação dos diferentes efetores seriam suficientes para inibir a formação do complexo, o que explicaria a diferença de resposta a efetores no complexo formado por GlnZ (Figura 16) e GlnB (Figura 22). Para confirmar essa hipótese, novos ensaios em concentrações controladas de proteína são necessários.

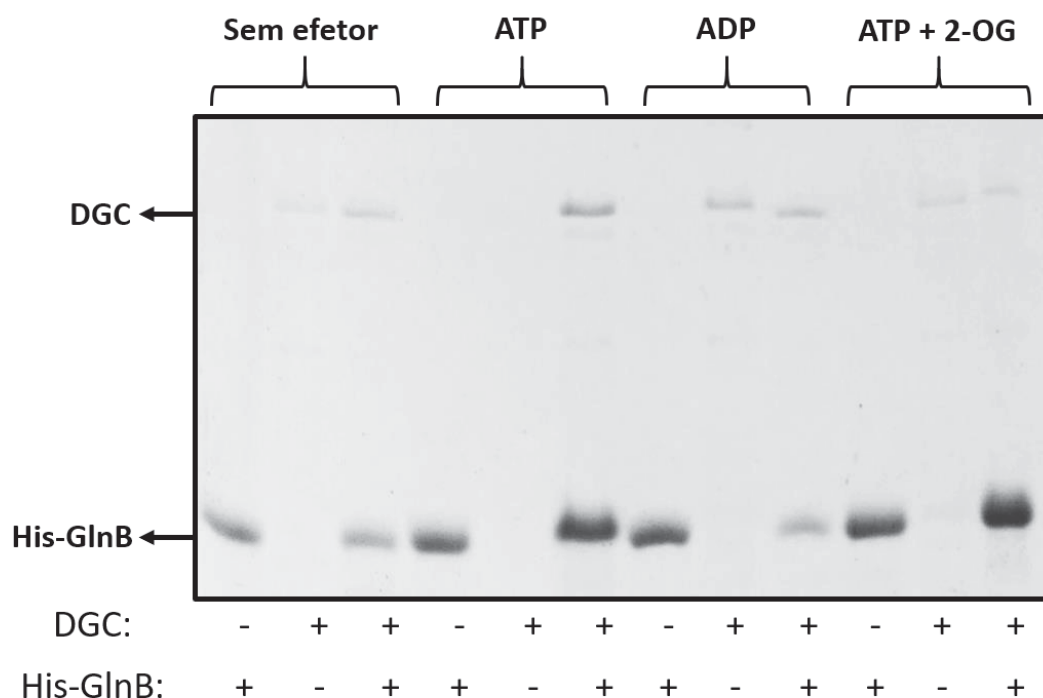


FIGURA 23 – FORMAÇÃO DE COMPLEXO ENTRE GlnB E DGC *IN VITRO*. A formação do complexo foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença dos efetores indicados na concentração de 1 mM. O sistema de interação consistiu de 400 µL de tampão de interação contendo His-GlnB purificada (15 µg) e/ou extrato celular da superexpressão de DGC (30 µg) e foi incubado por 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Tricina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

5.5 FOSFODIESTERASE

O gene *AZOBR_p1130052* de *A. brasilense Sp245* está anotado no banco de dados UNIPROT como *Putative Diguanilate cyclase/phosphodiesterase with PAS/PAC domain*, uma provável diguanilato ciclase/fosfodiesterase com domínio PAS/PAC (UNIPROT CONSORTIUM, 2018). A análise da sequência de aminoácidos pelo Pfam (FINN *et al.*, 2016) mostrou que a proteína possui 838 aminoácidos distribuídos em três domínios PAS, além de um GGDEF e um EAL (Figura 23). O domínio GGDEF, entretanto, apresenta o motivo degenerado como SADEF, sugerindo que esta proteína não possui atividade de diguanilato ciclase. O domínio EAL apresenta similaridade significativa (*E-value*: 5.9e-71) com a sequência modelo (HMM) do Pfam. A conservação dos domínios sugere que essa é uma fosfodiesterase. Portanto, a proteína expressa a partir desse gene será, neste trabalho, referenciada como Fosfodiesterase (PDE).

(A)

10	20	30	40	50
MSSTIERYLL	AEKAGSEGVW	DWDLRND	TMF LSPRFKEFLG	LPPGEINRPE
60	70	80	90	100
DWLDHVPDD	IDWLYASFEG	QMVGVSLPFQ	IEHRVRRAGA	GLSPDNGDSG
110	120	130	140	150
WRWLVCRGMA	VPDESGDPVR	LVGSVADITD	RKHAEAQLRK	SEERYALAAA
160	170	180	190	200
ASNDGLWDWD	LDAGTAYYSP	RWLSLLGLEE	GSIGNSPDEW	MERVHSDDRR
210	220	230	240	250
SLREALDALG	GENTVFQIEY	RVHHADGGIR	WMACRGIAVL	DAQGRPVRLV
260	270	280	290	300
GSQADVTDRK	TAEQRLQSE	ERYALAAAGA	NDGLWDWRLD	TDQVYYSRW
310	320	330	340	350
AAMLGFAVDS	LSNRIGEWFD	RVHPDDLGL	RTAFDLHLTG	EREHLQHVF
360	370	380	390	400
IQAADGDELW	MLVRGLAVRD	GSGRAVRIAG	SMTDITAKR	AEQQLLFD
410	420	430	440	450
HDGMTGLPNR	TLLLDRIQQA	LDRNRRAGGK	AFAVIFVDLD	RFKSINDALG
460	470	480	490	500
SSVGDRLLKT	IAERLDETRR	MGDTLARI	SADEFAVLDDGI	DDVGDALSAA
510	520	530	540	550
ERMGEAVARP	LALDGHDLVL	SASIGIALSV	SGYDRAEEM	RDASLAMYRA
560	570	580	590	600
KSGGRAR	IDV FDSNLRRQAM	AQMRTETDLR	MALEQDQLVL	YYQPIVALSS
610	620	630	640	650
GQIAGFEALM	RWKHPERGLV	PPGEFIPLAE	ESGLIVPMGR	WALRVAARQL
660	670	680	690	700
GQWQARFPRS	TPLFMSVNV	SRQFSDDDLI	GLVSEVLQES	RVPPSSSLKLE
710	720	730	740	750
ITESLLMKDP	AKCRVLMQGI	RDMDVRLSID	DFGTGYSSL	YLHKFPADTL
760	770	780	790	800
KIDRSFVQAI	SSGEGNAAIV	QVIATLAAIL	GMDAVAEGVE	TEMESEFLRD
810	820	830		
IMCKYAQGYL	YARPAPADAI	EALLLREAE	PLALPSLA	

(B)



FIGURA 24 – SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E ORGANIZAÇÃO DE DOMÍNIOS DA FOSFODIESTERASE (PDE) DE *A. brasilense* Sp245. (A) Sequência de aminoácidos da proteína PDE. Em fundo verde estão os aminoácidos dos três domínios PAS. O domínio GGDEF está em fundo vermelho. O motivo GGDEF degenerado como SADEF está destacado em branco. Em fundo azul está o domínio EAL. (B) Representação gráfica da organização dos domínios (coloridos) na sequência de aminoácidos (barra cinza). FONTE: O autor, 2018.

A investigação de outras proteínas no genoma de *A. brasilense* Sp245 (WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2011) contendo o domínio EAL associado à domínios GGDEF (funcionais ou não) foi realizada com o auxílio da ferramenta *ScanProsite* (GASTEIGER *et al.*, 2003) e revelou a presença de 10 sequências, sendo a PDE deste trabalho uma delas.

No trabalho de Gerhardt (2015), a PDE também apareceu como possível ligante de GlnZ na presença de ATP. Na eluição, comparada com o controle, a proteína se mostrou 328 vezes mais concentrada.

5.5.1 Expressão da Fosfodiesterase

O plasmídeo pAHUPDE foi transformado em *E. coli* BL21 (λ DE3), conforme Item 4.7, e a expressão da proteína recombinante induzida, conforme Item 4.8. A proteína foi superexpressa de maneira solúvel, como mostrado na Figura 24.

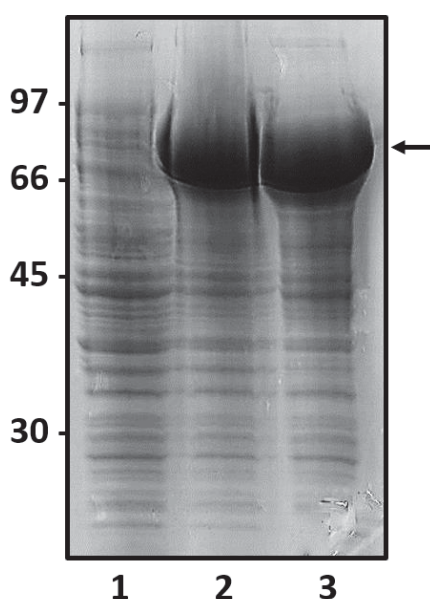


FIGURA 25 – EXPRESSÃO DE PDE DE *A. brasilense*. A expressão da proteína recombinante em *E. coli* BL21(DE3) foi analisada por Glicina-SDS-PAGE 10% sob condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. Os marcadores de tamanho molecular estão indicados à esquerda em kDa. Linhas 1 e 2: extrato celular de *E. coli* BL21(DE3) possuindo o plasmídeo pAHUPDE antes (0h) e depois (20h) da indução da expressão com 0,25 mM de IPTG a 18°C, respectivamente. Linha 3: a proteína PDE aparece solúvel na altura de 93 kDa (seta) no sobrenadante após a lise e centrifugação das células. FONTE: O autor, 2018.

Para a purificação da proteína PDE, também foram testadas as resinas *DEAE*, *Heparin*, *SP*, *Q* e *CM*. Assim como para a DGC, nenhuma das resinas apresentou resultados satisfatórios na purificação da fosfodiesterase. Dessa forma, os ensaios de coprecipitação descritos a seguir também foram realizados com o extrato celular derivado da precipitação com sulfato de amônio (Item 4.13).

5.5.2 Ensaio de interação por coprecipitação

Para avaliar a interação da PDE com GlnZ de *A. brasilense*, foram realizados ensaios de coprecipitação nas mesmas condições dos ensaios realizados com a DGC. Inicialmente, a interação foi analisada por ensaio de coprecipitação das proteínas His-GlnZ na presença dos efetores ATP, ADP e ATP + 2-OG, na concentração de 1 mM. Na Figura 25 observa-se bandas referentes às proteínas PDE e His-GlnZ, sugerindo a formação de um complexo tanto na ausência quanto na presença de ATP ou ADP. Quando 2-OG foi adicionado junto ao ATP, não foi observada a banda referente a DGC indicando que esse efector impede a formação do complexo His-GlnZ/PDE.

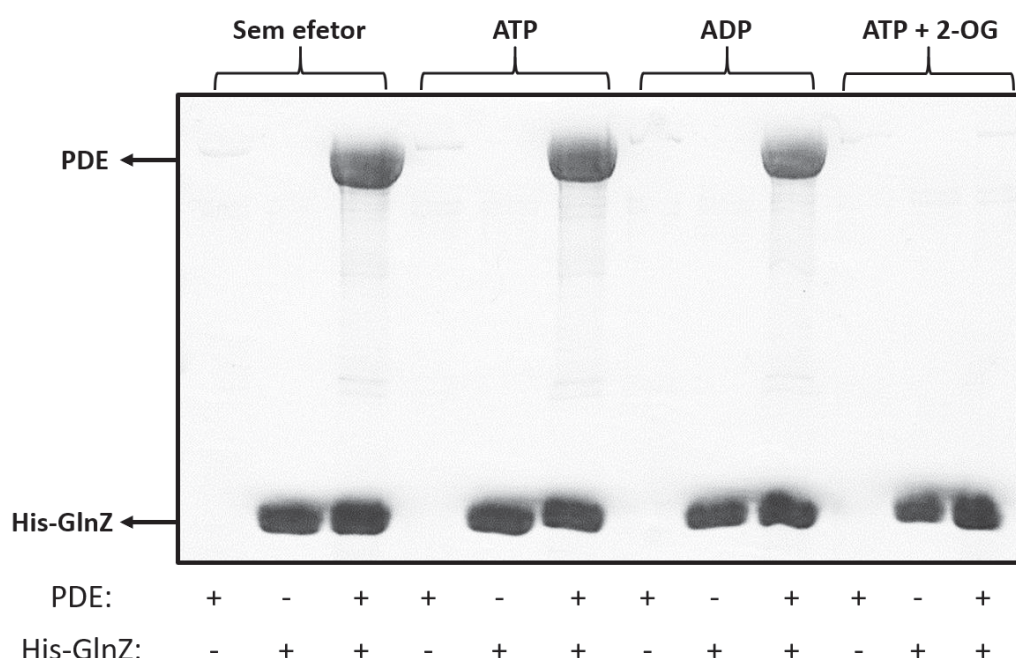


FIGURA 26 – FORMAÇÃO DE COMPLEXO ENTRE GlnZ E PDE *IN VITRO*. A formação do complexo foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença dos efetores indicados na concentração de 1 mM. O sistema de interação consistiu de 400 µL de tampão de interação contendo His-GlnZ purificada (15 µg) e/ou extrato celular da superexpressão de PDE (30 µg) e foi incubado por 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Tricina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

Através de coprecipitações na presença de 1mM ATP e diferentes concentrações de 2-OG, foi avaliada a influência da presença de 2-OG na formação do complexo His-GlnZ/PDE (Figura 26). Foi achado que o aumento da concentração de 2-OG leva a uma diminuição da banda referente a PDE. Na condição de 0,01 mM 2-OG, a formação do complexo His-GlnZ/PDE ainda é detectada, embora a banda referente à PDE seja menos intensa do que na ausência de 2-OG. Concentrações de

2-OG maiores que 0,01 mM foram suficientes para inibir a formação do complexo entre PDE e His-GlnZ. Na ausência de His-GlnZ observa-se uma banda tênue possivelmente referente à ligação inespecífica de PDE à resina. O mesmo efeito inibitório do 2-OG foi observado em ensaios de coprecipitação na presença de 1 mM de ADP (Figura 27). Em um primeiro momento, esses resultados sugerem que, da mesma forma que para DGC, nas condições testadas *in vitro*, o efeito inibitório do 2-OG sobre a interação entre a proteína PII e PDE parece ser independente da presença de ATP ou ADP.

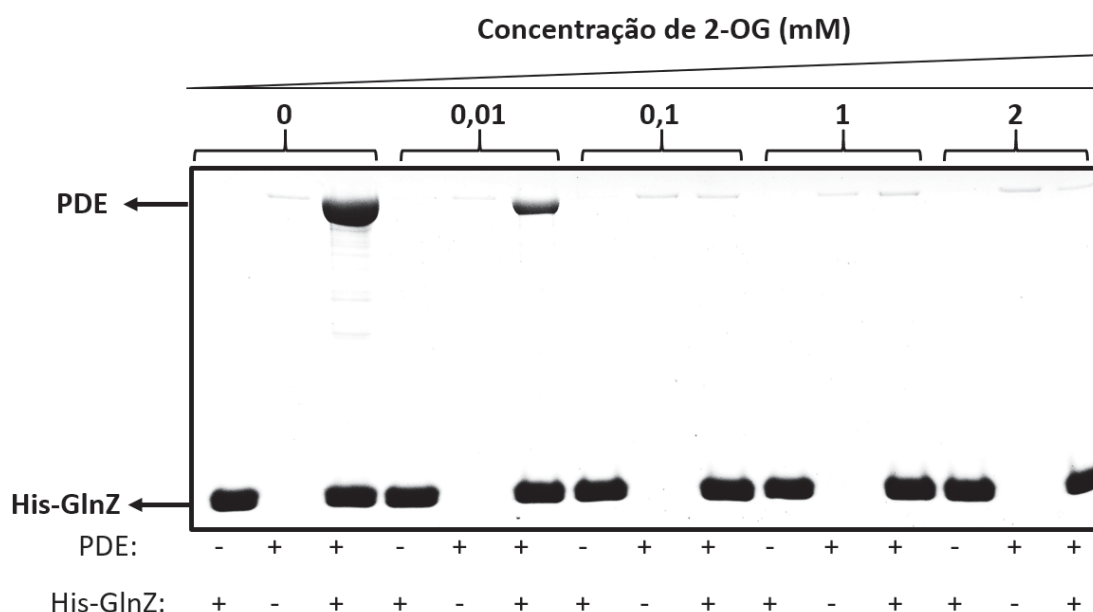


FIGURA 27 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE 2-OG NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO GlnZ/PDE *IN VITRO* NA PRESENÇA DE ATP. A formação do complexo foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença de 1 mM ATP e concentrações indicadas de 2-OG. O sistema de interação consistiu de 400 µL de tampão de interação contendo His-GlnZ purificada (15 µg) e/ou extrato celular da superexpressão de PDE (30 µg) e foi incubado por 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Tricina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

Assim como nos ensaios de atividade com diguanilato ciclases, as fosfodiesterases necessitam da presença de Mg^{2+} (CHRISTEN *et al.*, 2005). Por isso, foi avaliado se a ausência desse íon poderia interferir na formação do complexo His-GlnZ/PDE *in vitro* (Figura 28). Diferentemente do que acontece com a DGC (Figura 19), a presença de Mg^{2+} aparenta ser essencial para a interação da PDE com His-GlnZ.

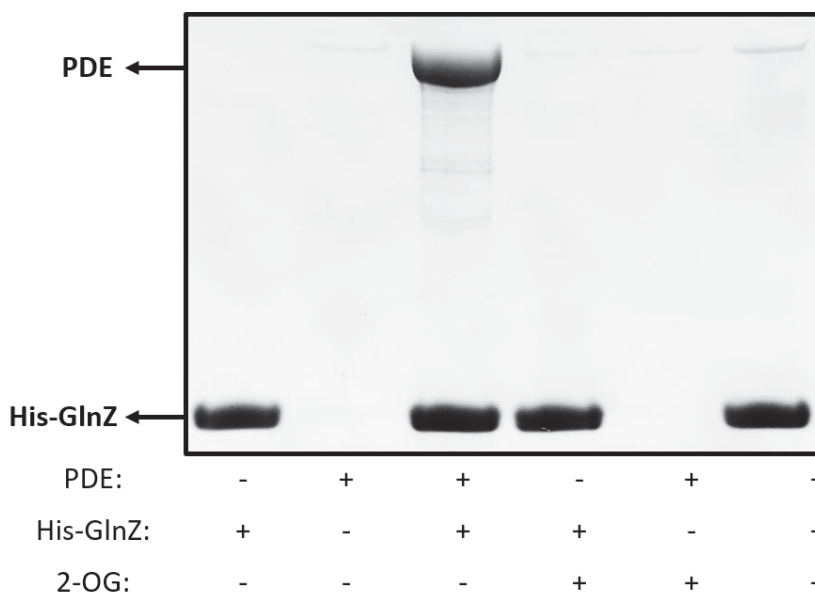


FIGURA 28 – EFEITO DO 2-OG NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO GlnZ/PDE *IN VITRO* NA PRESENÇA DE ADP. A formação do complexo foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença de 1 mM ADP e presença ou ausência de 1 mM 2-OG. O sistema de interação consistiu de 400 μ L de tampão de interação contendo His-GlnZ purificada (15 μ g) e/ou extrato celular da superexpressão de PDE (30 μ g) e foi incubado por 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Tricina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

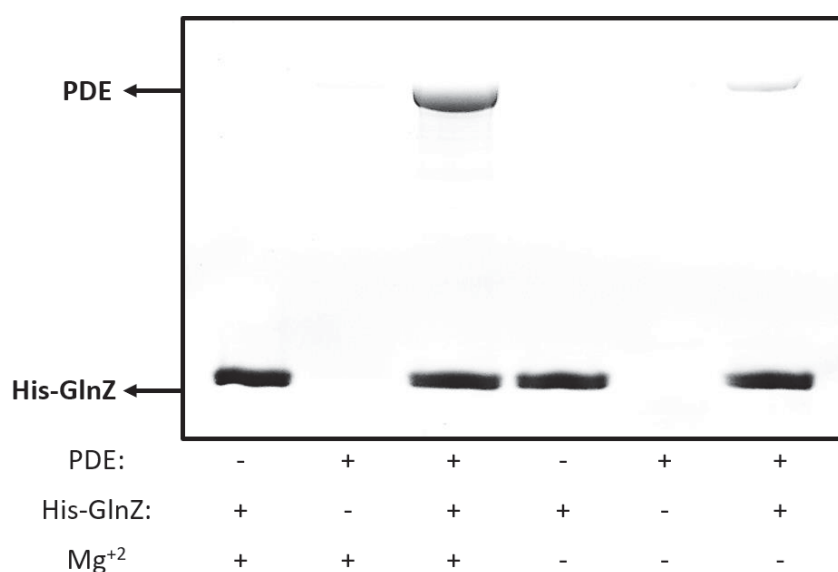


FIGURA 29 – EFEITO DE Mg⁺² NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO GlnZ/PDE *IN VITRO*. A formação do complexo foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença de 1 mM ATP e presença ou ausência de Mg⁺² no TI. O sistema de interação consistiu de 400 μ L de tampão de interação contendo His-GlnZ purificada (15 μ g) e/ou extrato celular da superexpressão de PDE (30 μ g) e foi incubado por 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Tricina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

Foi investigado se a região da alça-T é ou não essencial para a interação da PDE com PII, utilizando a variante His-GlnZ Δ T-loop. Foi observado que a interação e

formação do complexo se manteve, porém não foi inibida pela presença de 2-OG (Figura 29). Essa ausência de efeito de 2-OG é consistente com dados obtidos para outras interações, uma vez que a região da alça é essencial para a alteração conformacional de PII induzida pela ligação de 2-OG. Dessa forma, os dados obtidos sugerem que a interação GlnZ-PDE não se dá via alça-T.

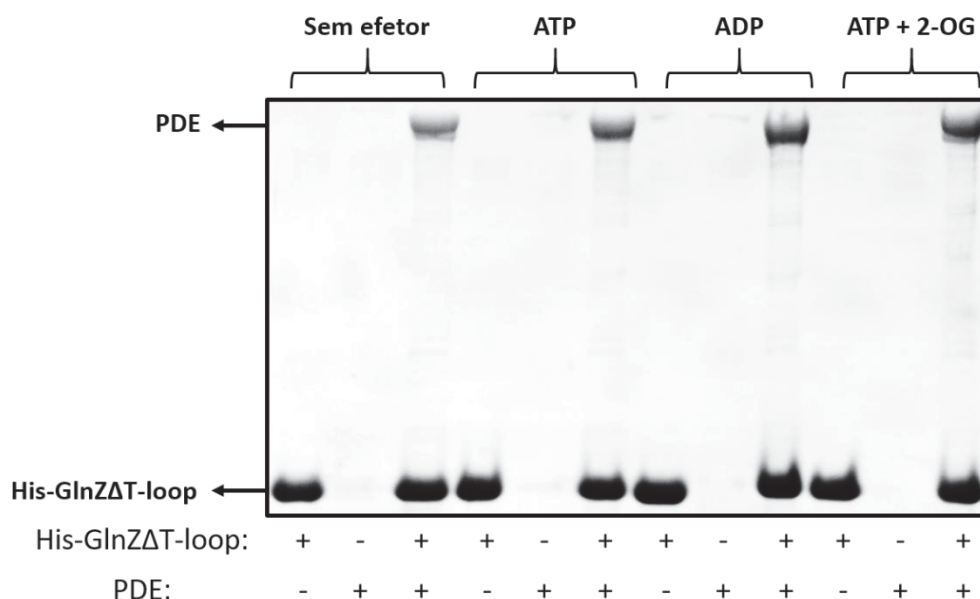


FIGURA 30 – FORMAÇÃO DE COMPLEXO ENTRE GlnZΔT-LOOP E PDE *IN VITRO*. A formação do complexo foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença dos efetores indicados na concentração de 1 mM. O sistema de interação consistiu de 400 µL de tampão de interação contendo His-GlnZΔT-loop purificada (15 µg) e/ou extrato celular da superexpressão de PDE (30 µg) e foi incubado por 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Tricina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

Como a estrutura da alça-T não se mostrou importante para a formação do complexo His-GlnZ/PDE, esperava-se que a uridililação de PII não interferisse na interação. Um ensaio de interação por coprecipitação com His-GlnZ-UMP₃ e PDE confirmou essa hipótese. Na Figura 30 observa-se a formação do complexo His-GlnZ-UMP₃/PDE de maneira estável e respondendo aos efetores de forma muito similar ao complexo formado com His-GlnZ não uridililada (Figura 25). A diferença é o enfraquecimento da banda da PDE na presença de ADP nas condições testadas, sugerindo que a formação do complexo ainda ocorre, mas de maneira menos intensa.

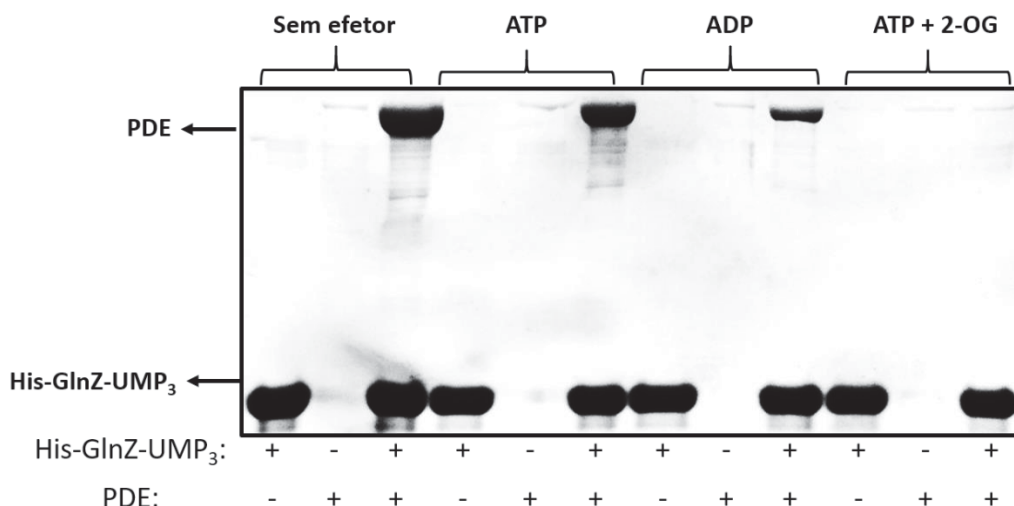


FIGURA 31 – FORMAÇÃO DE COMPLEXO ENTRE GlnZ-UMP₃ E PDE *IN VITRO*. A formação do complexo foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença dos efetores indicados na concentração de 1 mM. O sistema de interação consistiu de 400 µL de tampão de interação contendo His-GlnZ-UMP₃ purificada (15 µg) e/ou extrato celular da superexpressão de PDE (30 µg) e foi incubado por 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Tricina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

Por fim, foi visualizado que PDE também possui capacidade de formar complexo com GlnB, a outra proteína PII de *A. brasilense*. A formação do complexo His-GlnB/PDE foi investigada na presença de ATP, ADP e ATP + 2-OG (Figura 31). A banda referente à PDE nesse complexo parece ser menos intensa do que a do complexo His-GlnZ/PDE (Figura 25). Adicionalmente, o ensaio de interação por coprecipitação sugere que o complexo His-GlnB/PDE só é formado na ausência de efetores ou na presença de ATP, respondendo negativamente à presença de 2-OG junto ao ATP. A presença de ADP não se mostrou favorável à formação do complexo His-GlnB/PDE. A interação de PDE com GlnB aparenta ser menos estável do que a com GlnZ e, dessa maneira, as pequenas alterações conformacionais induzidas pela ligação de ADP também seriam suficientes para inibir a formação do complexo, o que explicaria a diferença de resposta ao ADP no complexo formado por GlnZ (Figura 25) e GlnB (Figura 31).

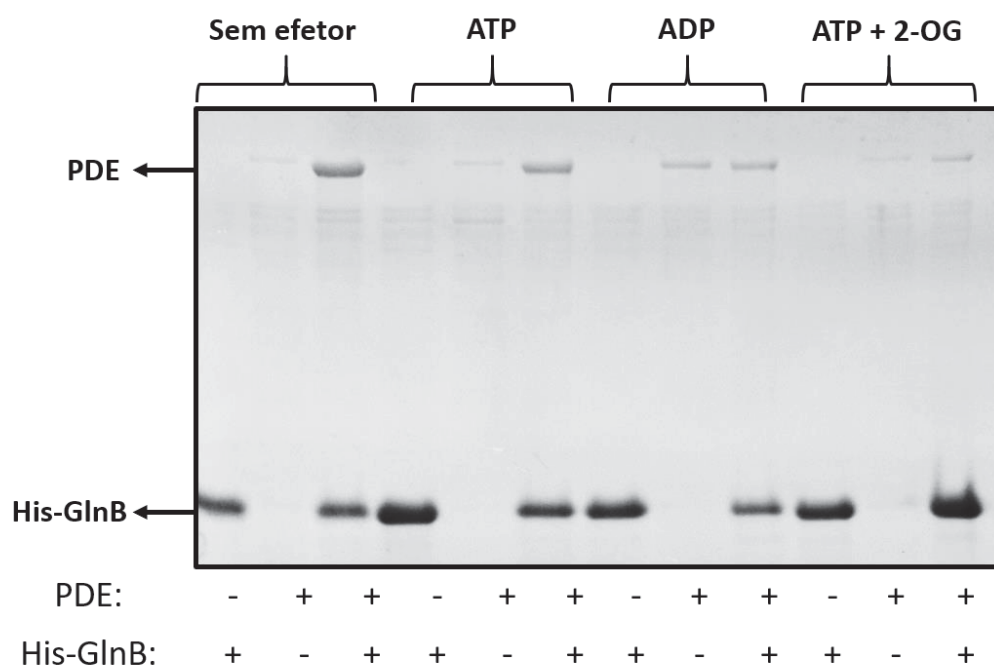


FIGURA 32 – FORMAÇÃO DE COMPLEXO ENTRE GlnB E PDE *IN VITRO*. A formação do complexo foi avaliada por coprecipitação utilizando resinas magnéticas de níquel (Item 4.16). As reações foram realizadas na presença dos efetores indicados na concentração de 1 mM. O sistema de interação consistiu de 400 µL de tampão de interação contendo His-GlnB purificada (15 µg) e/ou extrato celular da superexpressão de PDE (30 µg) e foi incubado por 15 minutos. As proteínas eluídas da resina foram analisadas por Tricina-SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes e o gel corado com Azul de Coomassie. FONTE: O autor, 2018.

6 DISCUSSÃO

Em 2015, Gerhardt identificou 125 proteínas como potenciais alvos de interação de proteínas PII em *A. brasilense* FP2. O presente trabalho teve como objetivo investigar e validar onze dessas possíveis interações através da amplificação e inserção dos genes codificadores em vetor de expressão, expressão heteróloga das proteínas e, por fim, ensaios de coprecipitação dessas proteínas com PII para identificar interações proteína-proteína.

Para a amplificação dos genes foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores e, dos onze genes propostos, sete foram amplificados com sucesso (Tabela 6). O DNA molde utilizado nas reações de amplificação foi o de *A. brasilense* FP2, mas os iniciadores foram baseados no genoma de *A. brasilense* Sp245 (GenBank/NCBI código de acesso 11059). Apesar da semelhança entre as estirpes, confirmada pela amplificação de sete genes, pequenas diferenças em suas sequências nucleotídicas podem explicar a dificuldade de anelamento dos iniciadores e a consequente falha na amplificação dos genes *AZOBR_p1130052*, *ptsI* e *purC*.

A inserção dos genes amplificados de *A. brasilense* FP2 em vetores de expressão resultou em duas construções: pAHUrpoNHis (pET-28a::*rpoN*) que expressa RpoN e pEGEIIA (pET-29a::*AZOBR_p430053*) que expressa a proteína EIIA^{Ntr}. Adicionalmente, foram sintetizadas outras três construções, baseando-se no genoma de *A. brasilense* Sp245: pAHUptsI (pET-29a::*ptsI*), pAHUDGC (pET-29a::*AZOBR_140132*) e pAHUPDE (pET-29a::*AZOBR_p1130052*), que expressam as proteínas EI, DGC e PDE, respectivamente.

A bactéria *E. coli* foi utilizada como sistema de expressão de proteínas recombinantes e tem sido o sistema de expressão heteróloga mais utilizado no mundo (SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2008). Suas principais vantagens, em comparação a outros sistemas, como o uso dos eucariotos, são a simplicidade, rapidez e baixo custo (BRONDYK, 2009; SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2008). As cepas de *E. coli* para expressão de proteínas recombinantes possuem algumas características, como deficiência na produção de proteases e manutenção da estabilidade dos plasmídeos de expressão (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005). As cinco construções foram transformadas em *E. coli* BL21 (λDE3) e suas respectivas proteínas (RpoN, EI, EIIA^{Ntr}, DGC e PDE) foram expressas e obtidas solúveis, com exceção de EI, que foi expressa em sua forma insolúvel. Quando proteínas são expressas em altos níveis em *E. coli*,

elas podem ocorrer tanto na forma solúvel como em formas insolúveis. É comum encontrar proteínas expressas apenas de forma insolúvel, agregadas em chamados corpos de inclusão (VENTURA; VILLAVERDE, 2006). Ainda não é compreendido o exato mecanismo que forma os corpos de inclusão. Entretanto, é proposto que as proteínas, além de serem expressas em um microambiente diferente de seu original em termos de pH, osmolaridade, potencial redox, cofatores e mecanismos de dobramento, também são expressas em grande quantidade e traduzidas mais rápido do que podem se dobrar em sua estrutura nativa. Uma proteína que se mantém somente na estrutura primária ou é parcialmente dobrada apresenta regiões hidrofóbicas expostas que podem interagir entre si e com outras proteínas similares, formando os agregados (BURGESS, 2009a; CARRIÓ; VILLAVERDE, 2002; HARTLEY; KANE, 1988; ROSANO; CECCARELLI, 2014). Há técnicas que possibilitariam a recuperação *in vivo* ou *in vitro* da solubilidade da proteína EI, que envolvem alteração dos parâmetros de indução (tempo, temperatura e concentração de IPTG) ou o uso de agentes solubilizantes, diferentes sais e/ou pH. (BURGESS, 2009a). Porém, neste trabalho, foram utilizadas as proteínas expressas em suas formas solúveis: RpoN, EIIA^{Ntr}, DGC e PDE.

A proteína RpoN foi purificada por cromatografia de afinidade. A presença de 6 histidinas em sua porção N-terminal gera grande afinidade pelo Ni²⁺ na matriz da coluna cromatográfica, o que permitiu a obtenção da proteína purificada em quantidade suficiente (Figura 10), como é usual da técnica (CROWE *et al.*, 1994).

As proteínas EIIA^{Ntr}, DGC e PDE foram submetidas a uma triagem para identificar resinas cromatográficas para serem utilizadas no processo de purificação. Para a purificação da proteína EIIA^{Ntr}, foi escolhida a resina aniônica DEAE. A afinidade da proteína por essa resina é justificada pelo seu ponto isoelétrico (pI) teórico de 4,78, calculado através da ferramenta *Compute pI/Mw* (BJELLQVIST *et al.*, 1993; GASTEIGER *et al.*, 2005). O pH do tampão utilizado na purificação (Item 4.12) foi 8,0, nessa condição a carga líquida da proteína é negativa e essa deve se ligar à resina aniônica, caso não exista uma assimetria muito grande em suas regiões carregadas (HUANG *et al.*, 2007; SCOPES, 1994). Apesar do resultado satisfatório para a purificação de EIIA^{Ntr} (Figura 12), nenhuma das resinas foi eficaz na purificação de DGC e PDE. Com pI teórico semelhante (DGC: 5,53 e PDE: 4,91), esperava-se que as proteínas ligassem em resinas aniônicas, na mesma condição de purificação que EIIA^{Ntr}. Porém, o uso das resinas aniônicas (DEAE e Q), catiônicas (CM e SP) ou

de afinidade (heparina) não resultaram em uma purificação eficiente para DGC e PDE. A carga líquida e consequente ligação das proteínas às resinas de carga oposta depende do pH, como citado, mas nem sempre a ligação ocorre quando as cargas são opostas. As resinas catiônicas foram testadas pois há proteínas que, por conta da assimetria de distribuição de suas cargas, se ligam à resina quando o pH é igual ao seu pI ou até mesmo quando sua carga líquida tem o mesmo sinal do que a carga da matriz cromatográfica (KARLSSON; HIRSH, 2011). Diante desse cenário, optou-se pela precipitação das proteínas dos extratos de expressão de DGC e PDE com sulfato de amônio (Item 4.13). A precipitação por sulfato de amônio é comumente empregada como uma etapa inicial de purificação (JANSON, 2011). Pelo fato das proteínas precipitarem em diferentes concentrações desse sal, é possível separar diferentes frações de proteínas precipitadas, conforme se aumenta a concentração de sulfato de amônio. Assim, é possível remover muitas proteínas do extrato de expressão, permitindo a obtenção da proteína superexpressa em frações comparativamente mais puras, de forma que ainda mantenham sua conformação e possível atividade ao final deste processo (BURGESS, 2009b; DUONG-LY; GABELLI, 2014; PURWANTO, 2016). Pelas características citadas e pelo fato de ensaios de coprecipitação preliminares utilizando o extrato solúvel de expressão de DGC ou PDE com GlnZ apresentarem ligação específica das proteínas com poucos contaminantes, provavelmente pela alta afinidade entre as duas, os extratos derivados da precipitação com sulfato de amônio de DGC e PDE foram utilizados nos ensaios de interação com PII.

Os genes codificadores das proteínas RpoN e EIIA^{Ntr} encontram-se no mesmo operon em diversos organismos, incluindo proteobactérias como *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (DEUTSCHER; FRANCKE; POSTMA, 2006; PFLÜGER-GRAU; GÖRKE, 2010). O trabalho de Gerhardt (2015) lista ambas proteínas como potenciais alvos de interação com PII. A RpoN apareceu naquele trabalho 32 vezes mais concentrada do que no controle, quando a interação se deu na presença de ATP e a eluição na presença de ATP + 2OG. Entretanto, nas condições experimentais do presente trabalho, a proteína recombinante não apresentou interação com GlnZ na presença de ATP ou ADP (Figura 11). A proteína RpoN foi expressa fusionada a uma cauda de polihistidina N-terminal, o que pode ter interferido em sua estrutura conformacional e, consequentemente, na possível interação com GlnZ. Além disso, ao se ligar na resina através da cauda, o possível sítio de interação com GlnZ pode ter sido ocluído nos

ensaios de interação. A cauda de polihistidina é uma das caudas de afinidade mais utilizadas pois, além de ser pequena (geralmente 6 aminoácidos) e espera-se que não interfira ou interfira muito pouco na estrutura da proteína, permite a purificação através de cromatografia de afinidade a íons (como Ni^{2+}) (MAJOREK *et al.*, 2014). Entretanto, existem casos onde a presença da cauda de polihistidina causa interferências estruturais ou na atividade de proteínas. Por exemplo, um receptor corticotrópico murídeo apresenta duas configurações conformacionais diferentes, dependendo de onde a cauda está inserida (N- ou C- terminal), embora isso não altere a afinidade da proteína por ligantes (KLOSE *et al.*, 2004). Em outro caso, a presença da cauda em um fragmento de anticorpo de cadeia única alterou negativamente a sua afinidade de ligação ao epítipo (GOEL *et al.*, 2000). Além disso, o trabalho de Gerhardt (2015) encontrou outros fatores de transcrição sigma como potenciais alvos de PII: RpoD (32 vezes concentrado) e RpoH (23x). Adicionalmente, apareceram também subunidades da RNA polimerase: α (45x), β (63x) e ω (250x). Esses dados sugerem que GlnZ pode regular a atividade da RNA Polimerase em *A. brasilense*, mas que, possivelmente, a identificação de RpoN se deu por interação indireta com PII, através da formação de um complexo com três ou mais proteínas.

Assim como com RpoN, não foi possível validar a interação entre GlnZ e EIIA^{Ntr}. Nos ensaios de Gerhardt (2015), EIIA^{Ntr} foi listada como potencial ligante de GlnZ na presença de ATP. Na eluição com ATP e 2-OG, a proteína se mostrou 16 vezes mais concentrada do que no controle. Entretanto, nos ensaios de coprecipitação realizados neste trabalho na presença de ATP e ADP, não foi detectada interação entre EIIA^{Ntr} e GlnZ (Figura 13). É possível que essa proteína também tenha sido listada como potencial alvo de PII a partir de interações indiretas com GlnZ, ou que a interação dependa do estado de fosforilação de EIIA^{Ntr}. É fato que o estado de fosforilação de EIIA^{Ntr} é capaz de induzir diferentes respostas celulares por permitir ou inibir sua interação com alvos específicos (VAN HEESWIJK; WESTERHOFF; BOOGERD, 2013). Em *E. coli*, EIIA^{Ntr} desfosforilada, por exemplo, interage com o transportador de potássio TrkA, inibindo sua atividade (LEE *et al.*, 2007). Adicionalmente, o estado de fosforilação de EIIA^{Ntr} modula a atividade da histidina quinase PhoR (LÜTTMANN; GÖPEL; GÖRKE, 2012). Há proteínas EIIA^{Ntr} mutadas que mimetizam o estado fosforilado (RONNEAU *et al.*, 2016), e a obtenção de uma proteína EIIA^{Ntr} de *A. brasilense* semelhante seria uma alternativa para testar essa hipótese. A proteína TrkA, alvo conhecido de EIIA^{Ntr}, também foi listada como

potencial alvo de interação com PII em *A. brasilense* (Tabela 1). Isso permite levantar a hipótese de que, mesmo não sendo um alvo direto de GlnZ, EIIA^{Ntr} participa de um possível complexo proteico composto, inclusive, por PII. Por fim, há a possibilidade de que as interações entre GlnZ e EIIA^{Ntr} ou RpoN *in vivo* não existam ou que, *in vitro*, as condições e componentes do método não tenham sido suficientes para a formação dos complexos. Até o momento, os resultados obtidos sugerem que não há interação *in vitro* entre GlnZ e RpoN (Figura 11) e GlnZ e EIIA^{Ntr} (Figura 13) na presença de 1 mM ATP ou ADP.

A proteína GlnZ de *A. brasilense*, purificada contendo cauda de polihistidina, coprecipitou com DGC (Item 5.4.2) e PDE (Item 5.5.2) em diversos cenários testados *in vitro*, como resumido na Figura 32. Foi observada a interação entre GlnZ e DGC na presença de ATP, ADP, bem como na ausência de efetores (Figura 16), corroborando o resultado de Gerhardt (2015), que registrou uma possível interação na presença de ATP, uma vez que a proteína estava 16x mais concentrada do que no controle. A formação do complexo GlnZ/PDE aconteceu nas mesmas condições (Figura 25), confirmando os resultados de Gerhardt (2015) que observou que PDE estava 328x mais concentrada após a eluição com ATP+2-OG.

	DGC	PDE
Interação com GlnZ	Sem efetores, ATP, ADP	
Inibição por 2-OG	Sim (com ATP ou ADP)	
Mg ²⁺	Não essencial	Essencial
Alça-T	Essencial	Não essencial (exceto resposta a 2-OG)
Uridililação de GlnZ	Não interfere	

FIGURA 33 – CARACTERÍSTICAS DA FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS ENTRE GlnZ E DGC OU PDE. FONTE: O autor, 2018.

A formação dos complexos GlnZ/DGC e GlnZ/PDE foi inibida pela adição de 2-OG junto ao ATP, de maneira dependente da concentração de 2-OG (Figura 17 e Figura 26), mais uma vez corroborando Gerhardt (2015), ou pela adição de 2-OG junto ao ADP (Figura 18 e Figura 27). A formação dos complexos na presença de ATP e inibição pela adição de 2-OG é comparável com outras interações de PII descritas.

Em *A. brasilense*, a proteína BCCP forma complexo com GlnZ na presença de ATP, fenômeno que é inibido pela adição de 2-OG (RODRIGUES *et al.*, 2014). Em *Synechococcus elongatus*, a interação entre PII e NAGK é favorecida pela presença de ATP, mas também inibida pela presença de 2-OG (FOKINA *et al.*, 2010). Esse fenômeno, como visto nas Figuras 17 e 18, pode ser explicado pela desestabilização ou inibição da formação do complexo devido à diferentes conformações adotadas por PII dependendo dos efetores ligados a ela: ATP ou ATP + 2-OG (TRUAN *et al.*, 2010). O mesmo não deveria acontecer quando o complexo é formado na presença de ADP, pois a ligação de 2-OG à PII é dependente de ATP.Mg (TRUAN *et al.*, 2014).

Nas Figuras 18 e 27 é possível observar que a presença de 2-OG foi capaz de inibir a formação dos complexos GlnZ/DGC e GlnZ/PDE, respectivamente, formados na presença de ADP. Há duas possíveis explicações para isso: (a) o ADP utilizado neste ensaio, adquirido comercialmente, garante 95% de pureza, e isso indica que é possível que haja a presença de ATP, mesmo em baixas concentrações. De fato, estudos anteriores determinaram a presença de 1,6 % de ATP em solução de ADP (GERHARDT *et al.*, 2012). Em *A. brasilense* é sugerido que, na formação dos complexos GlnZ/AmtB e GlnZ/DraG, a ligação de GlnZ a ATP ou a ADP seja determinada pela concentração de 2-OG, que favorece a ligação de PII a ATP (GERHARDT *et al.*, 2012). Dessa forma, mesmo mínimas concentrações de ATP junto ao ADP seriam suficientes para favorecer a ligação de ATP a PII na presença de 2-OG, induzindo a mudança conformacional de GlnZ e impedindo a formação dos complexos GlnZ/DGC e GlnZ/PDE; (b) é possível que DGC e PDE, e não GlnZ, estejam ligando 2-OG e impedindo a formação do complexo. São necessários mais testes para determinar com clareza o efeito do 2-OG na presença do ADP. Uma alternativa para testar essas hipóteses seria a repetição do ensaio de interação com ADP e 2-OG sem a presença do íon Mg^{2+} , pois PII liga ATP junto a 2-OG somente na presença de Mg^{2+} (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013; MERRICK, 2015; TRUAN *et al.*, 2014). Dessa forma, na ausência do íon, 2-OG não alteraria a afinidade de GlnZ por ATP, impedindo a mudança conformacional induzida por ATP+2-OG. A sugestão de que DGC e PDE estariam ligando 2-OG e alterando a afinidade de formação do complexo seria reforçada caso, na ausência de Mg^{2+} , o complexo ainda fosse desestabilizado pela presença de 2-OG.

Além de ensaios de atividade de diguanilato ciclases e fosfodiesterases requisitarem a presença de íons divalentes, como Mg^{2+} (CHRISTEN *et al.*, 2005;

STELITANO *et al.*, 2013), pode ser que interações de PII com alguns de seus alvos também sejam dependentes desse íon, como o complexo GlnK/BCCP de *E. coli* (RODRIGUES *et al.*, 2014). Por esses motivos, foi investigada se a ausência de Mg^{2+} no tampão de interação poderia interferir na formação dos complexos entre GlnZ e DGC ou PDE. Observou-se que a formação do complexo GlnZ/PDE é dependente da presença de Mg^{2+} (Figura 28), mas o complexo GlnZ/DGC se manteve estável tanto na presença quanto na ausência do íon (Figura 19).

A região da alça-T de PII é a mais flexível da proteína, alterando-se em resposta a ligação dos efetores e, consequentemente, levando a um estado conformacional que promova ou iniba a interação com seus alvos (TRUAN *et al.*, 2010; XU *et al.*, 1998). A maioria das interações descritas para PII e seus alvos ocorrem pela região da alça-T (GERHARDT, 2015). Para averiguar se essa região também é importante para a formação do complexo GlnZ/DGC, foi utilizada a proteína His-GlnZ Δ T-loop, que não possui os aminoácidos 42 a 54. Foi observado que, com a deleção da alça-T, o complexo deixa de existir na presença de qualquer efector (Figura 20). Esse resultado confirma que a presença da alça-T é essencial para a interação entre GlnZ e DGC, seja por ser o sítio de interação ou por sua importância ao estabilizar a conformação de GlnZ, de forma a permitir a formação do complexo. Em relação ao complexo GlnZ/PDE, a deleção da alça-T não evitou a interação entre as duas proteínas, e 2-OG deixou de modular negativamente a formação do complexo (Figura 29). Isso confirma que a estrutura da alça-T é importante para a alteração conformacional de PII induzida pela ligação de 2-OG, e consequente inibição da formação do complexo GlnZ/PDE, mas não é o sítio de interação com PDE.

Como a alça-T se mostrou importante para a formação do complexo GlnZ/DGC, surgiu a dúvida se a uridililação dessa região interferiria na interação, assim como nas interações de PII com DraG, DraT, AmtB e NtrB, por exemplo (HUERGO *et al.*, 2006, 2007; JIANG; NINFA, 1999; RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010). A coprecipitação das proteínas GlnZ uridililada (His-GlnZ-UMP₃) e DGC (Figura 21) indica que o complexo se manteve estável, da mesma forma que o observado para a proteína GlnZ não uridililada (Figura 16), sugerindo que a uridililação de PII não interfere na interação entre GlnZ e DGC.

Em relação ao complexo GlnZ/PDE, esperava-se que a uridililação de GlnZ não interferisse na interação, pois a formação do complexo não se mostrou dependente da alça-T, que é alvo da uridililação em proteobactérias (MERRICK,

2015). A coprecipitação de GlnZ-UMP₃ e PDE confirmou essa hipótese, pois houve a formação do complexo (Figura 30) respondendo aos efetores de forma muito similar ao complexo formado com GlnZ não uridililada (Figura 25). Esse resultado, porém, sugere que a interação entre PDE e GlnZ na presença de ADP é menos estável quando PII está uridililada.

As proteínas GlnZ e GlnB de *A. brasilense* apresentam 81% de similaridade entre suas sequências (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996). No presente trabalho, observou-se que a alta similaridade entre as proteínas não foi suficiente para GlnB manter a estabilidade na interação apresentada por GlnZ com DGC e PDE. Ensaios preliminares com a proteína His-GlnB indicam que a formação do complexo His-GlnB/DGC só acontece na presença de ATP, respondendo negativamente à adição de 2-OG (Figura 22), mas aparenta ser menos estável do que o complexo formado com GlnZ (Figura 16). A formação do complexo His-GlnB/PDE apresentou o mesmo comportamento, sendo, porém, mais estável na ausência de efetores (Figura 31). Entretanto, ainda aparenta ser menos estável do que o complexo formado com GlnZ (Figura 25). Por serem menos estáveis, os complexos His-GlnB/DGC e His-GlnB/PDE estariam mais propícios a serem formados com menor afinidade ou desfeitos devido às mudanças conformacionais induzidas pelos efetores (TRUAN *et al.*, 2010; XU *et al.*, 1998), o que explicaria a interação de DGC e PDE com GlnZ, mas não com GlnB, na presença de ADP. Como esses ensaios foram preliminares, a confirmação desses resultados depende de novos ensaios com concentrações controladas de proteínas.

As interações aqui descritas de GlnZ com DGC e PDE convergem em similaridade nos seguintes aspectos: acontecem na presença de ADP ou ATP e respondem negativamente à concentração de 2-OG (Figura 32). Por aparentemente interagirem com regiões distintas de PII e por se tratarem de enzimas com atividades opostas, é convidativa a ideia de que as duas possam interagir com PII ao mesmo tempo e que essa interação module suas atividades de maneira inversa. Resultados preliminares de atividade da DGC (dados não mostrados) sugerem que a presença de GlnZ pode aumentar a formação do produto c-di-GMP em até 20%. Assim, caso GlnZ regule negativamente a atividade de PDE (que degrada o c-di-GMP), essas interações favoreceriam o acúmulo e sinalização pelo segundo mensageiro em dado momento celular em *A. brasilense*. Mesmo que não ocorra modulação direta de PII sobre a atividade de DGC e PDE, a formação de um complexo ternário seria interessante de igual forma. Como proposto por Dahlstrom e O'Toole (2017), a

formação de complexos ternários ajudaria a explicar a especificidade da sinalização por c-di-GMP em algumas situações. Nesse caso, PII estaria direcionando espacialmente a sinalização pelo segundo mensageiro, de maneira que a co-localização de DGC e PDE garantiria que a sinalização não se difundisse a efetores mais distantes (Figura 33). Para maior elucidação desse cenário, são necessários ensaios buscando observar se há a formação de um complexo entre GlnZ, DGC e PDE, além de ensaios cinéticos buscando observar possíveis efeitos de PII sobre a atividade das enzimas na presença dos diferentes efetores.

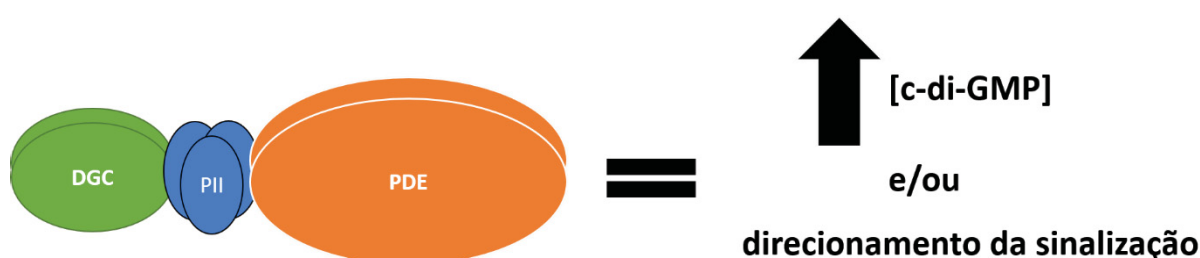


FIGURA 33 – HIPÓTESE DA FORMAÇÃO DE UM COMPLEXO TERNÁRIO ENTRE GlnZ, DGC E PDE. Nesse cenário, a formação do complexo ternário estaria influenciando a sinalização por c-di-GMP de duas formas: a) a proteína PII GlnZ estaria modulando DGC positivamente e PDE negativamente, levando a um acúmulo de diguanilato cíclico e/ou (b) a formação do complexo estaria, ao colocar DGC e PDE próximas uma da outra, direcionando e dando especificidade à sinalização. Fonte: O AUTOR, 2018.

O 2-OG é um importante metabólito envolvido na sinalização do estado do metabolismo de nitrogênio e carbono. Por participar da assimilação de nitrogênio por ação da glutamina sintetase, 2-OG indica a disponibilidade de carbono (de maneira diretamente proporcional) ou de nitrogênio (inversamente proporcional) (HUERGO; DIXON, 2015). Como citado, é possível que GlnZ esteja modulando a atividade e/ou especificidade de DGC e PDE. Essa modulação por interação proteína-proteína só aconteceria em baixas concentrações de 2-OG, uma vez que o complexo não é formado em altas concentrações desse efector. Portanto, nesse cenário, a produção e/ou sinalização de c-di-GMP seria influenciada pelos níveis de 2-OG. Com raras exceções, o acúmulo de c-di-GMP está associado com a diminuição de motilidade e produção de biofilme (GALPERIN; GOMELSKY, 2013). O'Neal e colaboradores (2017) demonstraram que o comportamento aerotático e os níveis intracelulares de c-di-GMP em *A. brasilense* estão ligados à fonte de carbono disponível: há maior acúmulo do metabólito quando as células são crescidas em malato ou succinato do que em frutose, por exemplo. Por fim, Zhang e colaboradores (2013; 2014)

demonstraram que os níveis de 2-OG aumentam após a adição de D-glucose ao meio de *E. coli* cultivadas em privação de carbono. Todos esses resultados indicam que se os níveis e funções de c-di-GMP em *A. brasilense* estejam realmente sendo influenciados pela formação dos complexos GlnZ/DGC e GlnZ/PDE, que por sua vez é responsiva à concentração de 2-OG, há grande possibilidade de PII não somente estar envolvida na modulação da motilidade, mas que essa modulação ocorra em resposta ao estado do metabolismo de carbono. Como não foram visualizados efeitos da uridililação de GlnZ sobre as interações, a formação dos complexos aparenta ser mais responsiva a sinais provenientes do metabolismo de carbono (como 2-OG) do que de nitrogênio. A hipótese de que PII pode estar envolvida na motilidade é embasada pela deficiência de motilidade apresentada por mutante *glnB* de *A. brasilense*, mesmo com aparente distribuição flagelar intacta (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996). Nesse mutante, a ausência de GlnB levaria à atividade de NtrC em condições de limitação e excesso de nitrogênio, de forma a superexpressar proteínas reguladas pelo sistema, como GlnZ (DE ZAMAROCZY, 1998). GlnZ superexpressa poderia, através da interação com DGC, induzir o aumento da produção de c-di-GMP, como indicam os resultados preliminares citados anteriormente. O acúmulo de c-di-GMP seria, então, o responsável pela diminuição da motilidade (Figura 34).

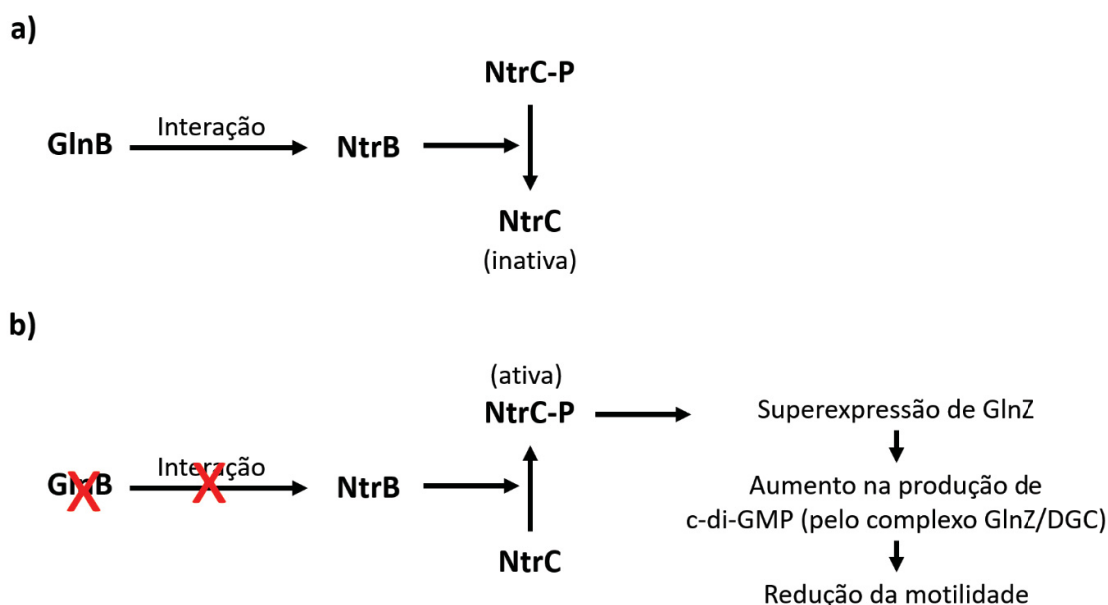


FIGURA 34 – HIPÓTESE PARA JUSTIFICAR A PERDA DE MOTILIDADE DE MUTANTES *glnB*.

(a) Em *A. brasilense*, a interação de GlnB com NtrB leva a inativação de NtrC (DE ZAMAROCZY, 1998); (b) Num cenário onde GlnB não esteja presente (como no mutante *glnB*), NtrB torna NtrC ativa, fosforilando-a. NtrC ativa leva a expressão de diversos genes com promotores do tipo sigma 54, inclusive *glnZ*. Dessa forma, NtrC sempre ativa levaria a uma superexpressão de *glnZ* que, por sua vez, aumentaria a produção de c-di-GMP pela sua interação com DGC. A produção elevada de c-di-GMP justificaria o fenótipo deficiente em motilidade do mutante *glnB*. Fonte: O AUTOR, 2018.

É importante lembrar que existem mais vinte prováveis diguanilato ciclases e nove prováveis fosfodiesterases identificadas no genoma de *A. brasilense* Sp245 (Itens 5.4 e 5.5). Mesmo que o par DGC/PDE aqui descrito pareça possuir maior afinidade *in vitro* por GlnZ, é possível também que a indicação da relativamente mais fraca interação com GlnB seja responsável pelo fenótipo observado por De Zamaroczy e colaboradores (1996). É possível também que, dentre as PDEs e DGCs presentes em *A. brasilense*, outras sejam responsáveis por esse fenótipo ao interagir com GlnB. Não é possível descartar que outras DGCs e PDEs interajam com GlnZ, mas essas não aparecem na lista de Gerhardt (2015), tornando o fenômeno improvável e contribuindo para a hipótese de que a sinalização específica por c-di-GMP se dá por interações proteína-proteína (DAHLSTROM; O'TOOLE, 2017).

7 CONCLUSÕES

- As proteínas DGC e PDE formam complexo com GlnZ na ausência ou presença dos efetores ATP ou ADP;
- A formação dos complexos DGC/GlnZ e PDE/GlnZ foi inibida pela adição de 2-OG junto ao ATP. A inibição induzida pelo 2-OG depende de sua concentração;
- A formação do complexo entre PDE e GlnZ é dependente de Mg^{2+} ;
- A deleção da alça-T de GlnZ extinguiu a formação do complexo com DGC e tornou o complexo com PDE irresponsivo ao 2-OG;
- A uridililação de GlnZ não influenciou a formação dos complexos DGC/GlnZ e PDE/GlnZ;
- A ausência de resposta ao estado de uridililação e a influência do 2-OG sobre a formação dos complexos DGC/GlnZ e PDE/GlnZ indicam que GlnZ interage com essas proteínas, e possivelmente modula suas atividades, respondendo muito mais ao estado do metabolismo de carbono do que ao de nitrogênio;
- A formação de complexo entre DGC ou PDE e GlnB é menos estável do que com GlnZ e, aparentemente, ocorre na presença de ATP, sendo inibida pela presença de 2-OG;
- A proteína DGC (AZOBR_140132) de *A. brasilense* Sp245 possui um domínio GGDEF conservado e, por isso, tem potencial para atuar como uma diguanilato ciclase;
- A proteína PDE (AZOBR_p1130052) de *A. brasilense* Sp245 possui domínios GGDEF e EAL. O motivo GGDEF, entretanto, é degenerado, o que a classifica como uma possível fosfodiesterase;
- As proteínas RpoN (*rpoN*) e EIIANtr (AZOBR_p430053) de *A. brasilense* FP2 não foram capazes de formar complexo com GlnZ na presença de ATP ou ADP.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, G.; GREER, S. E.; ZHULIN, I. B. Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 182, n. 21, p. 6042–6048, 2000.
- AMIKAM, D.; GALPERIN, M. Y. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 3–6, 2006.
- ARAUJO, L. M. *et al.* Different responses of the GlnB and GlnZ proteins upon in vitro uridylylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD protein. **Brazilian Journal of Medical And Biological Research**, [s.l.], v. 41, n. 4, p.289-294, abr. 2008.
- ARAUJO, G. T. **Caracterização *in vitro* das enzimas málica MaeB e N-acetil glutamato quinase NAGK e interação com proteínas PII em *Azospirillum brasilense***. Dissertação. (Mestrado em Ciências - Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Em fase de elaboração.
- ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. P II Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 80–105, 2001.
- BALDANI, J. I. *et al.* *Azospirillum*. In: WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2015. p. 1–35.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 77, n. 3, p. 549–579, abr. 2005.
- BARENDT, T. R. M. *et al.* Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. **Nature**, [s. l.], v. 459, n. 7249, p. 1015–1018, 2009.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 8, p. 521–577, 2004.
- BEGLEY, T. P.; KINSLAND, C.; STRAUSS, E. The biosynthesis of coenzyme a in bacteria. In: **Vitamins and hormones**. [s.l: s.n.]. v. 61p. 157–171.
- BHOSALE, M.; BHASKARLA, C.; NANDI, D. Peptidase B (*Escherichia coli*). In: RAWLINGS, NEIL D.; SALVESEN, G. S. (Eds.). **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 3. ed. [s.l.] : Academic Press, 2013. p. 1492–1494.
- BJELLQVIST, B. *et al.* The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. **Electrophoresis**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1023–1031, 1993.

BOSSEMEYER, D. *et al.* K⁺-transport protein TrkA of *Escherichia coli* is a peripheral membrane protein that requires other trk gene products for attachment to the cytoplasmic membrane. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 264, n. 28, p. 16403–10, 1989.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRONDYK, W. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. **Methods in enzymology**, [s. l.], v. 463, n. 9, p. 131–47, 2009.

BROWN, T. A. **Gene cloning & DNA analysis: an introduction**. 6. ed. Chichester, UK: Wiley-Blackwell, 2012.

BUCK, M. *et al.* The bacterial enhancer-dependent σ^{54} (σ^N) transcription factor. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 182, n. 15, p. 4129–4136, 2000.

BURGESS, R. R. Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. In: BURGESS, R. R.; DEUTSCHER M. P. (Eds.), **Methods in Enzymology**. [S. l.]: Academic Press, 2009a. p. 259-282.

BURGESS, R. R. Protein Precipitation Techniques. In: BURGESS, R. R.; DEUTSCHER M. P. (Eds.), **Methods in Enzymology**. [S. l.]: Academic Press, 2009b. p. 331–342.

BURILLO, S. *et al.* Interactions between the Nitrogen Signal Transduction Protein PII and N-Acetyl Glutamate Kinase in Organisms That Perform Oxygenic Photosynthesis. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 186, n. 11, p. 3346–3354, 2004.

CARREÑO-LÓPEZ, R. *et al.* Characterization of chsA, a new gene controlling the chemotactic response in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 191, n. 6, p. 501–507, 2009.

CARRIÓ, M. M.; VILLAVERDE, A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. **J Biotechnol**, v. 96, n.1, p. 3-12, 2002.

CHAN, C. *et al.* Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 101, n. 49, p. 17084–17089, 2004.

CHEAH, E. *et al.* Structure of the *Escherichia coli* signal transducing protein PII. **Structure**, [s. l.], v. 2, n. 10, p. 981–990, 1994.

CHRISTEN, B. *et al.* Allosteric Control of Cyclic di-GMP Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 281, n. 42, p. 32015–32024, 2006.

CHRISTEN, M. *et al.* Identification and Characterization of a Cyclic di-GMP-specific Phosphodiesterase and Its Allosteric Control by GTP. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 280, n. 35, p. 30829–30837, 2005.

COLLOMS, S. D. Leucyl Aminopeptidase PepA A2. In: RAWLINGS, NEIL D.; SALVESEN, G. S. (Eds.). **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 3. ed. [s.l.] : Academic Press, 2013. p. 1484–1492.

COMMICHAU, F. M.; FORCHHAMMER, K.; STÜLKE, J. Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 167–172, 2006.

CONROY, M. J. *et al.* The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 104, n. 4, p. 1213–1218, 2007.

CORRATGÉ-FAILLIE, C. *et al.* Potassium and sodium transport in non-animal cells: The Trk/Ktr/HKT transporter family. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 67, n. 15, p. 2511–2532, 2010.

COTTER, P. A.; STIBITZ, S. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 17–23, 2007.

CROWE, J. *et al.* 6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expression/Purification. In: Harwood A. J. (Ed.). **Protocols for Gene Analysis**. New Jersey: Humana Press, 1994. p. 371–388.

DAHLSTROM, K. M. *et al.* Contribution of Physical Interactions to Signaling Specificity between a Diguanylate Cyclase and Its Effector. **mBio**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 1978–2015, 2015.

DAHLSTROM, K. M. *et al.* The inhibitory site of a diguanylate cyclase is a necessary element for interaction and signaling with an effector protein. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 198, n. 11, p. 1595–1603, 2016.

DAHLSTROM, K. M.; O'TOOLE, G. A. A Symphony of Cyclases: Specificity in Diguanylate Cyclase Signaling. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 179–195, 2017.

DE ZAMAROCZY, M. *et al.* Coexistence of two structurally similar but functionally different P(II) proteins in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 178, n. 14, p. 4143–4149, 1996.

DE ZAMAROCZY, M. Structural homologues P(II) and P(z) of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 449–463, 1998.

DEUTSCHER, J.; FRANCKE, C.; POSTMA, P. W. How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 939–1031, 2006.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.

DOBBELAERE, S. *et al.* Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Aust J Plant Physiol**, [s. l.], v. 28, n. 9, p. 871–879, 2001.

DUONG-LY, K. C.; GABELLI, S. B. Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. In: LORSCH, J. (Ed.). **Methods in Enzymology**. [s.l.: s.n.], 2014, p. 85–94.

EGLI, M. *et al.* Atomic-resolution structure of the cellulose synthase regulator cyclic diguanylic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 87, n. 8, p. 3235–3239, 1990.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 182, p. 285–300, 1990.

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, [s. l.], v. 47, p. 590–592, 1997.

EVEN, S. *et al.* Ribonucleases J1 and J2 : two novel endoribonucleases in *B. subtilis* with functional homology to *E. coli* RNase E. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 2141–2152, 2005.

FIBACH-PALDI, S.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 326, n. 2, p. 99–108, 2012.

FINN, R. D. *et al.* The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 279–285, 2016.

FOKINA, O. *et al.* Mechanism of 2-oxoglutarate signaling by the *Synechococcus elongatus* PII signal transduction protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 107, n. 46, p. 19760–19765, 2010.

FORCHHAMMER, K. PII signal transducers: novel functional and structural insights. **Trends in Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. 2, p. 65-72, fev. 2008.

GALPERIN, M. Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di-GMP : the First 25 Years of a Universal Bacterial. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 1–52, 2013.

GALPERIN, M. Y.; NIKOLSKAYA, a N.; KOONIN, E. V. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. **FEMS Microbiol. Lett.**, [s. l.], v. 203, n. 1, p. 11–21, 2001.

GASTEIGER, E. *et al.* ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 31, n. 13, p. 3784–3788, 2003.

GASTEIGER, E. *et al.* Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. [S. l.]: Humana Press, 2009, p. 571–607.

GENTNER, M. *et al.* Oligomer formation of the bacterial second messenger c-di-GMP: Reaction rates and equilibrium constants indicate a monomeric state at physiological concentrations. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 134, n. 2, p. 1019–1029, 2012.

GERHARDT, E. C. M. *et al.* Influence of the ADP/ATP ratio, 2-oxoglutarate and divalent ions on *Azospirillum brasilense* PII protein signalling. **Microbiology**, [s. l.], v. 158, n. 6, p. 1656–1663, 2012.

GERHARDT, E. C. M. **Identificação e estudo *in vitro* da interação entre proteínas PII e proteínas alvo**. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

GERHARDT, E. C. M. *et al.* The Bacterial signal transduction protein GlnB regulates the committed step in fatty acid biosynthesis by acting as a dissociable regulatory subunit of acetyl-CoA carboxylase. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 95, n. 6, p. 1025–1035, 2015.

GOEL, A. *et al.* Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 1523, n. 1, p. 13–20, 2000.

HALLBERG, Z. F. *et al.* Hybrid promiscuous (Hypr) GGDEF enzymes produce cyclic AMP-GMP (3', 3'-cGAMP). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 113, n. 7, p. 1790–1795, 2016.

HARTLEY, D. L.; KANE, J. F. Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. **Biochemical Society Transactions**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.101-102, abr. 1988.

HARTMANN, A.; BALDANI, J. I. The genus *Azospirillum*. In: DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K.-H., STACKEBRANDT, E. (Eds.) **The Prokaryotes**. 3. ed. New York, US: Springer-Verlag, 2006. 115–140.

HECHT, G. B.; NEWTON, A. Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. **Journal of bacteriology**, [s. l.], v. 177, n. 21, p. 6223–9, 1995.

HEINRICH, A. *et al.* The *Synechococcus elongatus* PII signal transduction protein controls arginine synthesis by complex formation with N-acetyl-l-glutamate kinase. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 5, p. 1303–1314, 2004.

HENGGE, R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. **Nature reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 263–273, 2009.

- HICKMAN, J. W.; HARWOOD, C. S. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 376–389, 2008.
- HOLLAND, L. M. *et al.* A staphylococcal GGDEF domain protein regulates biofilm formation independently of cyclic dimeric GMP. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 190, n. 15, p. 5178–5189, 2008.
- HUANG, J. *et al.* Purification of the N- and C-Terminal Subdomains of Recombinant Heavy Chain Fragment C of Botulinum Neurotoxin Serotype C. In: **Pichia Protocols**. 2. ed. New Jersey: Humana Press, 2007. v. 389p. 77–98.
- HUERGO, L. F. *et al.* Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 580, n. 22, p. 5232–5236, 2006.
- HUERGO, L. F. *et al.* Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 6, p. 1523–1535, 2007.
- HUERGO, L. F. *et al.* PII signal transduction proteins: Pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. **Microbiology**, [s. l.], v. 158, n. 1, p. 176–190, 2012.
- HUERGO, L. F.; CHANDRA, G.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins: Nitrogen regulation and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 251–283, 2013.
- HUERGO, L. F.; DIXON, R. The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, [s. l.], v. 79, n. 4, p. 419–35, 2015.
- HUNTER, J. L. *et al.* The *Vibrio cholerae* diguanylate cyclase VCA0965 has an AGDEF active site and synthesizes cyclic di-GMP. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 22, 2014.
- JAGGI, R. *et al.* The role of the T loop of the signal transduction protein PII of *Escherichia coli*. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 391, p. 223–228, 1996.
- JANSON, J. C. **Protein Purification**. 3. ed. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 2011.
- JAVELLE, A.; MERRICK, M. Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. **Biochemical Society transactions**, [s. l.], v. 33, n. Pt 1, p. 170–2, 2005.
- JIANG, P. *et al.* Structure/function analysis of the PII signal transduction protein of *Escherichia coli*: genetic separation of interactions with protein receptors. **Journal of bacteriology**, [s. l.], v. 179, n. 13, p. 4342–53, 1997.

JIANG, P.; NINFA, A. J. Regulation of Autophosphorylation of *Escherichia coli* Nitrogen Regulator II by the PII Signal Transduction Protein. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 181, n. 6, p. 1906–1911, 1999.

JIANG, P.; NINFA, A. J. *Escherichia coli* PII signal transduction protein controlling nitrogen assimilation acts as a sensor of adenylate energy charge in vitro. **Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 45, p. 12979–12996, 2007.

JIANG, P.; NINFA, A. J. Sensation and signaling of α -ketoglutarate and adenylate energy charge by the *Escherichia coli* PII signal transduction protein require cooperation of the three ligand-binding sites within the PII trimer. **Biochemistry**, [s. l.], v. 48, n. 48, p. 11522–11531, 2009.

JIANG, P.; ZUCKER, P.; NINFA, A. J. Probing interactions of the homotrimeric PII signal transduction protein with its receptors by use of PII heterotrimers formed in vitro from wild-type and mutant subunits. **Journal of bacteriology**, [s. l.], v. 179, n. 13, p. 4354–60, 1997.

KARLSSON, E.; HIRSH, I. Ion Exchange Chromatography. In: JANSON, J.-C. (Ed.). **Protein Purification**. 3. ed. [S. l.]: Willey, 2011, p. 93–133.

KAZMIERCZAK, M. J.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Alternative Sigma Factors and Their Roles in Bacterial Virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 527–543, 2005.

KHADEMI, S. *et al.* Mechanism of Ammonia Transport by Amt/MEP/Rh: Structure of AmtB at 1.35 Å. **Science**, [s. l.], v. 305, n. 5690, p. 1587 LP-1594, 2004.

KLOSE, J. *et al.* Hexa-histidin tag position influences disulfide structure but not binding behavior of *in vitro* folded N-terminal domain of rat corticotropin-releasing factor receptor type 2a. **Protein Science**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 2470–2475, 2004.

KRASTEVA, P. V. *et al.* *Vibrio cholerae* VpsT Regulates Matrix Production and Motility by Directly Sensing Cyclic di-GMP. **Science**, [s. l.], v. 327, n. 5967, p. 866–868, 2010.

KUMAGAI, Y. *et al.* Cyclic di-GMP Signaling Regulates Invasion by *Ehrlichia chaffeensis* of Human Monocytes. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 192, n. 16, p. 4122–4133, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [s.l.], v. 227, n. 5259, p.680-685, ago. 1970.

LEE, C.-R. *et al.* *Escherichia coli* enzyme IIA^{Ntr} regulates the K⁺ transporter TrkA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 104, n. 10, p. 4124–4129, 2007.

LEE, C. R. *et al.* Reciprocal regulation of the autophosphorylation of enzyme I^{Ntr} by glutamine and α -ketoglutarate in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 473–485, 2013.

LEE, E. R. *et al.* An Allosteric Self-Splicing Ribozyme Triggered by a Bacterial Second Messenger. **Science**, [s. l.], v. 329, n. 5993, p. 845–848, 2010.

LEONARDI, R. *et al.* Coenzyme A: back in action. **Progress in lipid research**, [s. l.], v. 44, n. 2–3, p. 125–53, 2005.

LÜTTMANN, D.; GÖPEL, Y.; GÖRKE, B. The phosphotransferase protein EIIA Ntr modulates the phosphate starvation response through interaction with histidine kinase PhoR in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 96–110, 2012.

MACHADO, H. B. *et al.* Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 37, n. 7, p. 549–553, 1991.

MAJOREK, K. A. *et al.* Double trouble-Buffer selection and His-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments. **Protein Science**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 1359–1368, 2014.

MARCHLER-BAUER, A. *et al.* CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 43, p. 222–226, 2015.

MERRICK, M. Post-translational modification of PII signal transduction proteins. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 6, p. 1–6, jan. 2015.

MOURE, V. R. *et al.* Heat stability of Proteobacterial PII protein facilitate purification using a single chromatography step. **Protein Expression And Purification**, [s.l.], v. 81, n. 1, p.83-88, jan. 2012.

NELSON, S. W. *et al.* Mechanism of Action of *Escherichia coli* Phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthetase. **Biochemistry**, [s. l.], v. 44, p. 766–774, 2005.

NORDLUND, S.; HÖGBOM, M. ADP-ribosylation, a mechanism regulating nitrogenase activity. **FEBS Journal**, [s. l.], v. 280, n. 15, p. 3484–3490, 2013.

O'NEAL, L. *et al.* Optogenetic Manipulation of Cyclic Di-GMP (c-di-GMP) Levels Reveals the Role of c-di-GMP in Regulating Aerotaxis Receptor Activity in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 199, n. 18, p. 1-18, 2017.

OLIVEIRA, M. C. *et al.* Cooperative substrate binding by a diguanylate cyclase. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 427, n. 2, p. 415–432, 2015.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.95-101, jun. 1984.

PEI, J.; GRISHIN, N. V. GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 210–216, 2001.

PÉREZ-MENDOZA, D. *et al.* A multi-repeat adhesin of the phytopathogen *Pectobacterium atrosepticum* is secreted by a Type I pathway and is subject to complex regulation involving a non-canonical diguanylate cyclase. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 719–733, 2011.

PFLÜGER-GRAU, K.; GÖRKE, B. Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 205–214, 2010.

POSTGATE, J. **Nitrogen Fixation**. 3. ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1998.

POWELL, B. S. *et al.* Novel Proteins of the Phosphotransferase System Encoded within the rpoN Operon of *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 270, p. 4822–4839, mar. 1995.

PULTZ, I. S. *et al.* The response threshold of *Salmonella* PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 86, n. 6, p. 1424–1440, 2012.

PURWANTO, M. G. M. The Role and Efficiency of Ammonium Sulphate Precipitation in Purification Process of Papain Crude Extract. **Procedia Chemistry**, [s. l.], v. 18, p. 127–131, 2016.

RADCHENKO, M. V; THORNTON, J.; MERRICK, M. Control of AmtB-GlnK complex formation by intracellular levels of ATP, ADP, and 2-oxoglutarate. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 285, n. 40, p. 31037–31045, 2010.

RAJENDRAN, C. *et al.* Crystal structure of the GlnZ-DraG complex reveals a different form of PII-target interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 108, n. 47, p. 18972–18976, 2011.

RAMÍREZ-MATA, A. *et al.* The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. **Research in Microbiology**, [s. l.], v. 167, n. 3, p. 190–201, 2016.

RAO, F. *et al.* The Functional Role of a Conserved Loop in EAL Domain-Based Cyclic di-GMP-Specific Phosphodiesterase. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 191, n. 15, p. 4722–4731, 2009.

RAO, F. *et al.* YybT Is a Signaling Protein That Contains a Cyclic Dinucleotide Phosphodiesterase Domain and a GGDEF Domain with ATPase Activity. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 285, n. 1, p. 473–482, 2010.

REIZER, J. *et al.* A proposed link between nitrogen and carbon metabolism involving protein phosphorylation in bacteria. **Protein Science**, [s. l.], v. 1, p. 722–726, 1992.

RODRIGUES, T. E. *et al.* Search for novel targets of the PII signal transduction protein in Bacteria identifies the BCCP component of acetyl-CoA carboxylase as a PII binding partner. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 91, n. 4, p. 751–761, 2014.

- RÖMLING, U.; LIANG, Z.-X.; DOW, J. M. Progress in Understanding the Molecular Basis Underlying Functional Diversification of Cyclic Dinucleotide Turnover Proteins. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 199, n. 5, p. 790-816, 2017.
- RONNEAU, S. *et al.* Phosphotransferase-dependent accumulation of (p)ppGpp in response to glutamine deprivation in *Caulobacter crescentus*. **Nature Communications**, [s. l.], v. 7, p. 11423, 2016.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 5, p.1-17, 17 abr. 2014.
- ROSS, P. *et al.* Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. **Nature**, [s.l.], v. 325, n. 6101, p.279-281, jan. 1987.
- ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. In situ localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. **Symbiosis**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 261-279, jan. 2003.
- RUSSELL, M. H. *et al.* Integration of the Second Messenger c-di-GMP into the Chemotactic Signaling Pathway. **mBio**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 1-13, 2013.
- SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 307, n. 1–2, p. 249–264, 2008.
- SAIKI, R. K. *et al.* Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 239, n. 4839, p. 487–491, 1988.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.
- SANT'ANNA, F. H. *et al.* The PII superfamily revised: A novel group and evolutionary insights. **Journal of Molecular Evolution**, [s. l.], v. 68, n. 4, p. 322–336, 2009.
- SCHÄGGER, H. Tricine–SDS-PAGE. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.16-22, jun. 2006.
- SCHIRMER, T. C-di-GMP Synthesis: Structural Aspects of Evolution, Catalysis and Regulation. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 428, n. 19, p. 3683–3701, 2016.
- SCHIRMER, T.; JENAL, U. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 724–735, 2009.
- SCHLOSSER, A. *et al.* NAD⁺ binding to the *Escherichia coli* K⁺-uptake protein TrkA and sequence similarity between TrkA and domains of a family of dehydrogenases suggest a role for NAD⁺ in bacterial transport. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 533–543, 1993.

SCHMIDT, A. J.; RYJENKOV, D. A.; GOMELSKY, M. The Ubiquitous Protein Domain EAL Is a Cyclic Diguanylate-Specific Phosphodiesterase: Enzymatically Active and Inactive EAL Domains. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 187, n. 14, p. 4774–4781, 2005.

SCOPES, R. K. Protein purification: principles and practice. **Springer advanced texts in chemistry**, [s. l.], v. 2, p. 17–18, 1994.

SEEFELDT, L. C.; HOFFMAN, B. M.; DEAN, D. R. Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 78, p. 701–722, 2009.

SESHASAYEE, A. S. N.; FRASER, G. M.; LUSCOMBE, N. M. Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 38, n. 18, p. 5970–5981, 2010.

SIMM, R. *et al.* GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 1123–1134, 2004.

SON, H. S.; RHEE, S. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 262, n. 18, p. 8690–8695, 1987.
SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 113–128, jan. 2005.

SRIVASTAVA, D. *et al.* Cyclic di-GMP inhibits *Vibrio cholerae* motility by repressing induction of transcription and inducing extracellular polysaccharide production. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 90, n. 6, p. 1262–1276, 2013.

STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. Biological Nitrogen Fixation. **Annual Review of Nutrition**, [s. l.], v. 13, p. 317–355, 1993.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 487–506, out. 2000.

STELITANO, V. *et al.* Probing the activity of diguanylate cyclases and c-di-GMP phosphodiesterases in real-time by CD spectroscopy. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 41, n. 7, p. 1–9, 2013.

STOCK, A. M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU, P. N. Two-Component Signal Transduction. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 69, p. 183–215, 2000.

STRAUSS, E. *et al.* The Identification and Characterization of Phosphopantothienoylcysteine Synthetase from *E. coli* Completes the Identification of Coenzyme A Biosynthetic Enzymes in Bacteria. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], 2001.

SUDARSAN, N. *et al.* Riboswitches in Eubacteria Sense the Second Messenger Cyclic Di-GMP. **Science**, [s. l.], v. 321, n. 5887, p. 411–413, 2008.

SUNDRIYAL, A. *et al.* Inherent Regulation of EAL Domain-catalyzed Hydrolysis of Second Messenger Cyclic di-GMP. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 289, n. 10, p. 6978–6990, 2014.

TAL, R. *et al.* Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. **Journal of bacteriology**, [s. l.], v. 180, n. 17, p. 4416–25, 1998.

TAMAYO, R. *et al.* Role of Cyclic Di-GMP during El Tor Biotype *Vibrio cholerae* Infection: Characterization of the In Vivo-Induced Cyclic Di-GMP Phosphodiesterase CdpA. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 1617–1627, 2008.

TOWNSLEY, L.; YILDIZ, F. H. Temperature affects c-di-GMP signalling and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 4290–4305, 2015.

TRUAN, D. *et al.* A New PII Protein Structure Identifies the 2-Oxoglutarate Binding Site. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 400, n. 3, p. 531–539, 2010.

TRUAN, D. *et al.* Structure and Thermodynamics of Effector Molecule Binding to the Nitrogen Signal Transduction PII Protein GlnZ from *Azospirillum brasilense*. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 426, n. 15, p. 2783–2799, 2014.

TUCKERMAN, J. R. *et al.* An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. **Biochemistry**, [s. l.], v. 48, n. 41, p. 9764–9774, 2009.

UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], 7 fev. 2018.

VAN HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H. V; BOOGERD, F. C. Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, [s. l.], v. 77, n. 4, p. 628–95, 2013.

VENTURA, S.; VILLAVERDE, A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. **Trends in Biotechnology**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.179-185, abr. 2006.

WASSMANN, P. *et al.* Structure of BeF³⁻-Modified Response Regulator PleD: Implications for Diguanylate Cyclase Activation, Catalysis, and Feedback Inhibition. **Structure**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 915–927, 2007.

WEST, A. H.; STOCK, A. M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. **Trends in Biochemical Sciences**, [s.l.], v. 26, n. 6, p.369-376, jun. 2001.

WISNIEWSKI-DYÉ, F. *et al.* *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. **PLoS Genetics**, [s. l.], v. 7, n. 12, 2011.

WOLFE, A. J.; VISICK, K. L. Get the message out: Cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 190, n. 2, p. 463–475, 2008.

XU, Y. *et al.* GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 282, n. 1, p. 149–165, 1998.

YOU, C. *et al.* Coordination of bacterial proteome with metabolism by cyclic AMP signalling. **Nature**, [s. l.], v. 500, n. 7462, p. 301–306, 2013.

ZÄHRINGER, F. *et al.* Structure and Signaling Mechanism of a Zinc-Sensory Diguanylate Cyclase. **Structure**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 1149–1157, 2013.

ZHANG, C.; WEI, Z.-H.; YE, B.-C. Quantitative monitoring of 2-oxoglutarate in *Escherichia coli* cells by a fluorescence resonance energy transfer-based biosensor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 97, n. 18, p.8307-8316, 28 jul. 2013.

ZHANG, C; YE, B.-C. A single fluorescent protein-based sensor for in vivo 2-oxoglutarate detection in cell. **Biosensors And Bioelectronics**, [s.l.], v. 54, p.15-19, abr. 2014.

ZHANG, N.; BUCK, M. A Perspective on the Enhancer Dependent Bacterial RNA Polymerase. **Biomolecules**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 1012–1019, 2015.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; ROBERTS, G. P. Cloning, sequencing, mutagenesis, and functional characterization of draT and draG genes from *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 174, n. 10, p. 3364–3369, 1992.

ZHANG, Z. *et al.* Polymorphism of the Signaling Molecule c-di-GMP. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 128, n. 21, p. 7015–7024, 2006.

ZHULIN, I. B. *et al.* Oxygen taxis and proton motive force in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 178, n. 17, p. 5199–5204, 1996.